

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Pathologische Biochemie
(Vorstand: Prof. Dr. med. W. LORENZ) an der Chirurgischen Universitätsklinik
(Direktor: Prof. Dr. med. H. HAMELMANN) der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Intestinale Diaminoxidase:

**Standardisierung und Optimierung eines Isotopentests,
Abtrennung von einer löslichen Monoaminoxidase
und Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung
des Enzyms bei experimenteller Darmischämie
am Kaninchen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Rudolf Hesterberg

aus Hagen

Marburg 1977

Intestinale Diaminoxidase:

**Standardisierung und Optimierung eines Isotopentests,
Abtrennung von einer löslichen Monoaminoxidase
und Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung
des Enzyms bei experimenteller Darmischämie
am Kaninchen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Rudolf Hesterberg

aus Hagen

Marburg 1977



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg / Lahn am 23. 9. 77

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. W. Lorenz

Coreferenten: Prof. Dr. F. Schneider
Prof. Dr. H. Giertz

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
I. 1. Die Diaminoxidase des Dünndarms, ein Schutzfaktor bei intestinaler Ischämie	1
I. 2. Ziel der Arbeit	9
II. <u>Material und Methodik</u>	11
II. 1. <u>Material</u>	11
II. 1.1. <u>Gewebsproben aus menschlichen Organen</u>	11
II. 1.2. <u>Versuchstiere</u>	11
II. 1.3. <u>Tierisches Organmaterial</u>	11
II. 1.3.1. Herstellung eines Enzympräparates zur gleichzeitigen Messung der Diaminoxidaseaktivität im NADH- und Isotopentest	11
II. 1.3.2. Extrakte zur Bestimmung der Diaminoxi- daseaktivität in tierischen Organen	12
II. 1.3.3. Reinigung der Diaminoxidase aus Kaninchendünndarm	13
II. 1.3.3.1. Materialgewinnung	13
II. 1.3.3.2. Löslichkeit der intestinalen Diaminoxidase	13
II. 1.3.3.3. Gelfiltration über Sephadex G 50 und G 200	14
II. 1.4. <u>Reagentien und Pharmaka</u>	15
II. 1.4.1. für den Isotopentest	15
II. 1.4.2. für den NADH-Test	16

	Seite
II. 1.4.3. für die Histaminbestimmung	17
II. 1.4.4. für die Narkose	18
II. 1.4.5. für die in vitro-Hemmversuche	18
II. 1.4.6. für die Versuche bei intestinaler Ischämie	18
II. 2. <u>Methodik</u>	19
II. 2.1. <u>Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität</u>	19
II. 2.1.1. Prinzip des Isotopentests	19
II. 2.1.2. Prinzip des NADH-Tests	20
II. 2.1.3. Durchführung des Isotopentests	21
II. 2.1.3.1. Inkubation	21
II. 2.1.3.2. Extraktion	21
II. 2.1.3.3. Szintillationszählung	22
II. 2.1.3.4. Leerwerte und Reaktionsgeschwindigkeit	22
II. 2.1.4. Durchführung des NADH-Tests	24
II. 2.1.4.1. Vorinkubation	24
II. 2.1.4.2. Messung	25
II. 2.1.4.3. Reaktionsgeschwindigkeit	25
II. 2.2. <u>Bestimmung der Histaminkonzentration im Gewebe und Perfusat</u>	27
II. 2.3. <u>Bestimmung der Proteinkonzentration</u>	27
II. 2.4. <u>Intestinale Ischämie</u>	28
II. 2.4.1. Perfusionsmodell	28
II. 2.4.1.1. Operationstechnik	29
II. 2.4.1.2. Messung des Blutdrucks und des Pulses	33

II. 2.4.1.3.	Untersuchungen des Perfusats	33
II. 2.4.2.	Untersuchung des Einflusses von Aminoguanidin auf die Überlebenszeit nach intestinaler Ischämie	34
II. 2.4.3.	Diaminoxidaseaktivität und Histamingehalt bei intestinaler Ischämie, Perfusion und Revaskularisation der Arteria mesenterica superior	35
II. 2.4.4.	Nachweis der intestinalen Ischämie	35
II. 2.4.4.1.	Histologische Untersuchung des Darmes	36
II. 2.4.4.2.	Messung der Sauerstoffspannung des Darmgewebes	36
II. 2.5.	<u>Statistische Berechnungen</u>	37
III.	<u>Ergebnisse</u>	38
III. 1.	<u>Standardisierung und Eichung der Isotopenmethode mit dem NADH-Test</u>	38
III. 1.1.	Inkubationsbedingungen	38
III. 1.1.1.	pH-Optimum	38
III. 1.1.2.	Phosphatpufferkonzentration	38
III. 1.1.3.	Substratoptimum und Michaelis-konstante	38
III. 1.2.	Extraktionsbedingungen	41
III. 1.3.	Zählausbeute	43
III. 1.4.	Kriterien für die Auswertung des Isotopen- und NADH-Tests	43
III. 1.4.1.	Reaktionskinetik	43

	Seite
III. 1.4.2.	Empfindlichkeit des Isotopen- und NADH-Tests 45
III. 1.4.3.	Reproduzierbarkeit und Präzision 45
III. 1.5.	Eichung des Isotopentests mit dem NADH-Test 46
III. 2.	<u>Diaminoxidaseaktivität in verschie- denen Organen, Plasma und Vollblut des Kaninchens</u> 49
III. 3.	<u>Diaminoxidase- und Histamingehalt in den verschiedenen Abschnitten des Darmes beim Menschen und Kaninchen</u> 49
III. 4.	<u>Reinigung und Charakterisierung der Diaminoxidase des Kaninchendün- darms</u> 52
III. 4.1.	Lokalisation des Enzyms in der Darm- wand und in der Zelle 52
III. 4.2.	Gelfiltration über Sephadex G 50 und 200 und Abtrennung einer lös- lichen Monoaminoxidase 52
III. 4.3.	Eigenschaften der Aminoxidasen des Kaninchendünndarms 58
III. 4.3.1.	Stabilität 58
III. 4.3.2.	pH-Optimum 58
III. 4.3.3.	Substratoptimum und Michaelis- konstante 58
III. 4.3.4.	Hemmstoffe 60
III. 5.	<u>Intestinale Ischämie</u> 64
III. 5.1.	Nachweis der intestinalen Ischämie 64
III. 5.1.1.	Sauerstoffspannung in der Darmwand 64

III. 5.1.2.	Histologische Untersuchung des ischämischen Darmgewebes	64
III. 5.1.3.	Makroskopische Veränderungen am ischämischen Darm	66
III. 5.2.	Die Diaminoxidaseaktivität im Kaninchendarm bei intestinaler Ischämie	66
III. 5.3.	Wirkung der Perfusion auf die Über- lebenszeit der Kaninchen nach intestinaler Ischämie	68
III. 5.4.	Der Einfluß von Ischämie und Per- fusion der Mesenterialgefäße auf Histamingehalt und Diaminoxidase- aktivität des Kaninchendarms	70
III. 5.5.	Beeinflussung der Überlebenszeit von Kaninchen nach intestinaler Ischämie durch die Verabreichung von Aminoguanidin in vivo	74
III. 5.5.1.	In vivo-Hemmversuche mit Aminogu- anidin	74
III. 5.5.2.	Untersuchung der Diaminoxidase- aktivität im Kaninchendarm nach Verabreichung von Aminoguanidin in vivo	76
IV.	<u>Diskussion</u>	78
IV. 1.	Bestimmung der Diaminoxidaseakti- vität im Isotopentest	78
IV. 2.	Vorkommen der Diaminoxidase im Gastrointestinaltrakt	81

	Seite
IV. 3.	Eigenschaften der intestinalen Diaminoxidase 82
IV. 4.	Nachweis und Folgen der experimen- tellen Ischämie am Kaninchendarm 84
IV. 5.	Perfusion der Mesenterialgefäße und Überlebenszeit bei intestinaler Ischämie 86
IV. 6.	Wirkungen von Aminoguanidin auf den Organismus 87
IV. 7.	Beeinflussung der Überlebenszeit nach Arteria mesenterica superior- Verschluß durch Hemmung der Diaminoxi- dase 89
IV. 8.	Diaminoxidasemangel und Krankheiten 91
V.	<u>Zusammenfassung</u> 92
VI.	<u>Literaturverzeichnis</u> 94

I. Einleitung

I. 1. Die Diaminoxidase des Dünndarms, ein Schutzfaktor bei intestinaler Ischämie

In der Chirurgie des akuten Abdomens stellt der Verschluß der oberen Mesenterialarterie ein häufigeres Krankheitsbild dar, als man zunächst vermuten möchte. Im Krankengut der Chirurgischen Universitätsklinik in Marburg und nach Angaben der Literatur macht es immerhin 0,25 % aller stationär behandelten Patienten aus. Um die Bedeutung dieser Zahl richtig beurteilen zu können, muß man wissen, daß von vergleichsweise häufigen Erkrankungen, wie dem Ulcus duodeni oder dem Rectumcarcinom auch nur ca. 2 % aller klinisch behandelten Fälle betroffen sind.

Ein Überblick über die Weltliteratur (Tab. 1) zeigt, daß die Letalität des Mesenterialinfarktes auch heute noch 80 - 90 % beträgt. Die von SENN (1969) vertretene Ansicht, daß es sich bei diesem Krankheitsbild um die trostloseste Variante des akuten Abdomens handelt, ist deshalb noch ohne Einschränkung gültig.

Wenn wir nach den pathophysiologischen Gründen für diese hohe Letalität fragen, so stehen zwei Tatsachen im Vordergrund:

1. Die chirurgische Wiederherstellung der Mesenterica-durchblutung erfolgt zu spät oder überhaupt nicht, so daß der Patient an der Durchwanderungsperitonitis und letztlich am septischen Schock zugrunde geht.
2. Auch wenn die Wiederherstellung der Mesenterica-durchblutung rechtzeitig erfolgt, ist der Patient durch ein mehr oder weniger protahiertes Kreislaufversagen gefährdet.

Autoren	Jahr	Fälle	Letali- tät (%)
Jenson, C.B. und Smith, G.A.	1956	51	88,6
Mavor, G.E., Lyall, A.D.,			
Chrystal, K.M.R. und Tsapogas, M.	1962	71	93,0
Zimberg, Y.H.	1963	21	88,0
Liavag, I.	1967	22	90,0
Ottinger, W. u. Austen, W.G.	1967	136	92,0
Huber, F.B.	1969	60	80,0
Senn, A.	1969	33	66,0
Pierce, G.E. u. Brockenbrough, E.			
D.	1970	56	100,0
Schellerer, W., Schellerer, K.,			
Decker, R. und Kliesch, G.	1971	20	78,0
Schennach, W. u. Dorfmann, A.	1972	32	85,0
Slater, H. und Elliott, D.W.	1972	18	96,0
Bergan, J.J., Dean, R.H., Conn			
Jr. J. und Yao, J.S.T.	1975	48	48,0
Havia, T. und Inberg, M.V.	1975	82	83,0
Eigene Fälle (Chirurgische Univ.-			
Klinik Marburg u. Chir. Klinik			
der Städt. Krankenanstalten			
Solingen)	1975	48	97,3

Tab. 1: Letalität des akuten Verschlusses der Mesenterialgefäße.

Überblick über die Weltliteratur (aus Richter
et al., Der Chirurg, 47 Jg., Heft 5, 1976,
S. 276 - 279)

Bis heute versuchte man, vorallem dem Kreislaufversagen durch Volumensubstitution zuvorzukommen. Bei dieser Therapie nahm man jedoch inkauf, daß die verhängnisvolle Wirkung von humoralen Faktoren, d.h. von vasoaktiven Polypeptiden und biogenen Aminen, darunter Histamin, nicht beeinflußt wurde. Dieses therapeutische Vorgehen war wohl dadurch zu erklären, daß man bisher von einem tatsächlichen Nachweis der Bedeutung dieser Faktoren in vivo kaum sprechen konnte. Wie umstritten diese möglichen "Darmtoxine" tatsächlich sind, zeigt eine Übersicht von GRUBER (1967), in der nicht weniger als 30 dieser Substanzen aufgeführt werden.

Eine Sonderstellung unter den aufgeführten Faktoren kann man den biogenen Aminen zuschreiben, da

- diese vasoaktiven Stoffe durch chemische Meßverfahren eindeutig identifizierbar sind,
- ihre pharmakologische Wirkung weitgehend bekannt ist und
- ein Eingriff in ihre ebenfalls bekannten Stoffwechselwege den Nachweis der Wirksamkeit dieser Substanzen auch in vivo ermöglicht.

Die reflektorische Freisetzung von Katecholaminen während einer "Alarmreaktion" (REIFFERSCHIED 1964) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit für die extreme Vasokonstriktion verantwortlich, die unmittelbar nach dem Eintreten eines Mesenterialarterienverschlusses im Versorgungsgebiet dieses Gefäßes zu beobachten ist. Eine Freisetzung von Serotonin, wie sie z. B. nach Druckschwankungen an der Darmwand (BÜLBRING und CREMA 1959), aber auch durch direkte Einwirkung einer Darmwandhypoxie (JANOFF et al. 1961, MUSTALA et al. 1968, FARA und HAGLUND 1973, STRAUSS et al. 1973) zu beobachten war, könnte die gesteigerte Darmmotilität in der Initialphase eines Mesenterialinfarktes (WILSON und BLOCK 1956, KHANNA 1959, WISE 1973) bedingen. Histamin, das im ischämischen

Darm sowohl freigesetzt, als auch gebildet werden kann (SCHAUER 1964, KUSCHE et al. 1972), könnte an der Kontraktur der Darmmuskulatur in der Frühphase eines Mesenterialinfarktes beteiligt sein, aber auch an der Vasodilatation und gesteigerten Permeabilität der Mesenterialgefäße, wie sie im späteren Stadium eines Mesenterialinfarktes zu beobachten sind.

Wie wir aus zahlreichen Untersuchungen wissen, erreichen gerade Serotonin und Histamin im Gastrointestinaltrakt ihre höchsten Konzentrationen (ERSPAMER 1966, LEMBECK 1953, LORENZ et al. 1973). Weiterhin können viele pharmakologisch hochaktive Amine, wie z. B. Tyramin, Phenyläthylamin, Tryptamin usw., von der intestinalen Bakterienflora durch Decarboxylierung der entsprechenden Aminosäuren gebildet werden.

Obwohl eine Beteiligung dieser Substanzen am pathophysiologischen Geschehen der Darmischämie nicht ausgeschlossen werden kann, so ist auf der anderen Seite ihre tatsächliche Rolle bei diesem Krankheitsgeschehen noch keineswegs nachgewiesen. Als Beweis einer Mitbeteiligung sollten für den in Frage kommenden Faktor folgende drei Kriterien erfüllt werden:

1. Der Faktor muß während der Revaskularisationsphase nach einer zeitlich begrenzten Darmischämie im zentralen Venenblut nachzuweisen sein.
2. Er muß chemisch identifiziert sein.
3. Er muß während einer Zeitspanne und in einer Konzentration gefunden werden, die auch bei einem scheinoperierten Tier mit Sicherheit ähnliche Effekte, z. B. eine entsprechende Hypotension auslöst.

Von allen Schockfaktoren bei intestinaler Ischämie werden diese drei Kriterien nur vom Histamin bei der experi-

mentellen Ischämie des Hundedünndarms (KUSCHE et al. 1977) und nahezu auch vom 'Myokardialdepressingfaktor' (LEFER et al. 1967) erfüllt.

Nach einer experimentellen Ischämie am Hundedarm konnte Histamin im zentralen Venenblut in Mengen nachgewiesen werden, die auch am gesunden Versuchstier eine Hypotension bewirkt hätten. Auf Grund des fluorometrischen Meßverfahrens und der ausgedehnten Voruntersuchungen von LORENZ et al. (1972) muß die im venösen Blut gefundene Substanz tatsächlich als Histamin angesehen werden. Ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Plasmahistaminspiegel und Darmischämie war aber nur nachweisbar, wenn Aminoguanidin, ein starker und hochspezifischer Hemmstoff der Diaminoxidase (Histaminase), den Tieren vor der Wiederherstellung der Mesentericadurchblutung verabreicht worden war. Da Histamin im Gastrointestinaltrakt außer durch Methylierung (BROWN et al. 1959, KIM et al. 1969, BARTH et al. 1972) hauptsächlich durch die Diaminoxidase inaktiviert wird, konnte dieses Ergebnis nur durch eine Hemmung der intestinalen Diaminoxidaseaktivität und somit des oxidativen Histaminabbaues erklärt werden. Nur unter dieser Voraussetzung konnte das im Darm freigesetzte oder neu gebildete Histamin einem Abbau soweit entzogen werden, daß es schließlich im venösen Blut nachweisbar war. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß sich auch die Überlebenszeit der Hunde statistisch signifikant verminderte, wenn Aminoguanidin vor der Revaskularisation bei intestinaler Ischämie verabreicht worden war.

Bei vielen Säugetieren und auch beim Menschen kommt die Diaminoxidase außer im Darm auch in anderen Organen vor, z. B. in der Niere, der Leber und der Lunge (BUFFONI 1966).

Eine Hemmung der Diaminoxidaseaktivität in diesen Organen könnte den Aminoguanidineffekt ebensogut erklären wie eine Hemmung des Enzyms im Darm.

Auf der Suche nach einer Spezies, die Diaminoxidaseaktivität nur im Darm aufwies, war es nötig, eine Bestimmungsmethode für das Enzym zu verwenden, die einfach durchzuführen war, sich durch Spezifität und Empfindlichkeit auszeichnete und sich in rohen Gewebspräparaten verwenden ließ. Hier bot sich der Isotopentest nach OKUYAMA und KOBAYASHI (1961) an, bei dem als Substrat des Enzyms ^{14}C markiertes Putrescin verwendet wurde. Dieser Test bot die Vorteile einer hohen Empfindlichkeit und einfachen Durchführung, jedoch mußten andere klinisch-chemische Kriterien, wie z. B. Präzision, Richtigkeit und z. T. auch Spezifität, noch genauer untersucht werden. Ferner war die beschriebene Originalmethode nicht vollständig den "recommendations of the commission on enzymes of the IUB" angepaßt, da die optimalen Reaktionsbedingungen und die Voraussetzungen zur Standardisierung des Testsystems nicht untersucht worden waren. Schließlich war es mit diesem Test bisher nicht möglich, die Enzymaktivität in internationalen Einheiten ($1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol Substratumsatz/min}$) auszudrücken, da die Extraktionsrate der radioaktiven Endprodukte der Enzymreaktion in die organische Phase nicht routinemäßig bestimmt werden konnte. Der Grund hierfür war das Fehlen eines echten inneren Standards, da ^{14}C - Δ_1 -Pyrrolin, das Endprodukt der Reaktion der Diaminoxidase mit ^{14}C -Putrescin, im Handel nicht erhältlich ist.

Alle genannten Anforderungen an einen klinisch-chemischen Test erfüllte die spektrophotometrische Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität (LORENZ et al. 1967, LORENZ et al. 1968, LORENZ et al. 1970). Mit dieser Methode wurde Ammoniak als ein Produkt der Diaminoxidaseaktivität erfaßt und mit Glutamatdehydrogenase in

einer Indikatorreaktion umgesetzt, wobei NADH zu NAD oxydiert wurde. Im Rahmen von Bestimmungen der Diaminoxidaseaktivität im Serum von schwangeren Frauen war dieser Test bereits der statistischen Qualitätskontrolle unterworfen worden. Gegenüber dem Isotopentest hatte der NADH-Test die Nachteile, daß er nur im Serum oder gereinigten Enzympräparaten angewendet werden konnte, schwieriger durchzuführen war als der Isotopentest und nicht dessen Empfindlichkeit erreichte.

Obwohl das Enzym bereits im Jahre 1929 von BEST entdeckt wurde, ist die Bedeutung der Diaminoxidase für den Organismus bis heute noch nicht völlig geklärt. Aufgrund der Substratspezifität des Enzyms wurden zwei Hypothesen für seine biologische Funktion entwickelt:

1. Aliphatische Diamine mit einer Kohlenwasserstoffkette von vier bis sechs Methylengruppen, besonders 1,4-Diaminobutan (Putrescin), sind die besten Substrate der Diaminoxidase (ZELLER 1938, LORENZ et al. 1967, LORENZ et al. 1968, KUSCHE et al. 1973). Da Putrescin und seine Derivate die Vorstufen von Polyaminen bilden, die wie Spermidin und Spermin (RUSSEL 1973) die Ribonukleinsäuresynthese während Wachstums- und Regenerationsprozessen stimulieren, könnte es eine Aufgabe der Diaminoxidase sein, die Konzentration von Polyaminen in der wachsenden Zelle zu kontrollieren.

Tatsächlich war ein hoher Anstieg der Diaminoxidaseaktivität bei keimenden Hülsenfrüchten zu beobachten (WERLE und PECHMANN 1949, WERLE et al. 1961). Auch in der Plazenta verschiedener Säuger (DANFORTH und GORHAM 1937, KAMESWARAN et al. 1962, KAPPELLER-ADLER 1965, SOUTHREN et al. 1968, PAOLUCCI et al. 1971) und im Blut von

schwangeren Frauen (MARCOU et al. 1938, AHLMARK 1944, KAPELLER-ADLER 1944, SOUTHREN et al. 1966, KUSCHE et al. 1974) konnte ein Anstieg der Diaminoxidaseaktivität nachgewiesen werden.

2. Histamin, ein biogenes Amin, dem unter manchen patho-physiologischen Bedingungen große Wirksamkeit zukommt, wird durch die Diaminoxidase rasch inaktiviert (BARDSLEY et al. 1970, KUSCHE et al. 1973). Dem Enzym könnte somit eine protektive Rolle gegenüber der Wirkung von Histamin zukommen, das in Organen und Körperflüssigkeiten freigesetzt wurde.

Beim Meerschweinchen ist beispielsweise das Auftreten eines anaphylaktischen Schocks stets von einem massiven Anstieg des Plasmahistaminspiegels begleitet. Wurde diesen Tieren der spezifische Diaminoxidasehemmstoff Aminoguanidin verabreicht, verminderte sich die Überlebensrate signifikant gegenüber mit Kochsalz behandelten Kontrolltieren (SCHMUTZLER et al. 1965). Dagegen war bei Meerschweinchen, die vor der Auslösung des anaphylaktischen Schocks eine Zufuhr von exogener Diaminoxidase erhalten hatten, die Überlebensrate gegenüber unbehandelten Kontrolltieren deutlich höher (WERLE und SCHIRREN 1965).

I. 2. Ziel der Arbeit

Mit Methoden, die den Anforderungen der klinischen Chemie angepaßt waren, wurde versucht, die Aktivität der Diaminoxidase im Intestinaltrakt verschiedener Säugerspezies zu bestimmen und die Eigenschaften des Enzyms zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, daß beim Kaninchen die Diaminoxidase ausschließlich im Darm, nicht jedoch in anderen Organen des Körpers nachweisbar war, so daß diese Spezies zur weiteren Untersuchung der Bedeutung des Enzyms im Darmtrakt als besonders geeignet erschien.

In der Absicht, die Spezifität der Wirkungen von Aminoguanidin im Zusammenhang mit der Diaminoxidaseaktivität bei intestinaler Ischämie weiter zu sichern und zusätzliche Hinweise auf die Bedeutung von Histamin bei diesem Krankheitsbild zu gewinnen, wurden an Kaninchen die folgenden Experimente durchgeführt:

1. In einer randomisierten Studie wurde am Kaninchen die Wirksamkeit von Aminoguanidin auf die Überlebenszeit nach Darmischämie untersucht sowie die Dosisabhängigkeit der beobachteten Effekte geprüft.
2. Nach i.v. Applikation von Aminoguanidin wurde dessen Vorhandensein in vivo im ischämischen Darm geprüft.
3. In der Annahme, daß das vasoaktive Substrat der Diaminoxidase Histamin bei der intestinalen Ischämie in die Mesenterialgefäße gelangt, wurde das Versorgungsgebiet der Arteria mesenterica superior mit Ringerlösung perfundiert und der Histamingehalt des Perfusats sowie die Beeinflussung der Überlebenszeit der Tiere durch die Perfusion geprüft.
4. Das Auftreten einer intestinalen Ischämie nach Verschuß der Arteria mesenterica superior wurde da-

durch nachgewiesen, daß im Darmgewebe die Sauerstoffspannung gemessen wurde und die ischämisch bedingten Veränderungen der intestinalen Mucosa histologisch untersucht wurden.

II. Material und Methodik

II. 1. Material

II. 1.1. Gewebeproben aus menschlichen Organen

Bei 19 Patienten der Chirurgischen Universitätsklinik in Marburg, die wegen verschiedener Erkrankungen des Magen-Darmtraktes zur Operation kamen, wurde intraoperativ Gewebe an mehreren Stellen des Dünndarms entnommen. Das Patientenkollektiv bestand aus 13 weiblichen und 6 männlichen Patienten im Alter von 18 - 78 Jahren. 4 Patienten litten an einer entzündlichen Darmerkrankung, 9 an einem Dickdarmtumor, 2 an einem Dünndarmtumor und 1 Patient an einem Magenkarzinom. In 2 Fällen lag ein Ileus und in einem Fall ein Verschlusßikterus vor. Die aus makroskopisch gesunden Darmabschnitten entnommenen Gewebeproben wurden bis zur Untersuchung bei minus 20° C aufbewahrt und zur Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität in der unten beschriebenen Weise aufbereitet (siehe II.1.3.2.).

II. 1.2. Versuchstiere

Für die Versuche mit experimenteller Darmischämie durch Verschlusß der Arteria mesenterica superior wurden reinrassige männliche Kaninchen (*Oryctolajus cuniculus*), Rasse Groß-Silber, Gewicht 2,4 - 3,4 kg verwendet. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten und 1 Woche lang eingewöhnt. Sie erhielten Solikanin Trockenfutter (Muskatwerke Düsseldorf) und Wasser ad libitum.

II. 1.3. Tierisches Organmaterial

II. 1.3.1. Herstellung eines Enzympräparates zur gleichzeitigen Messung der Diaminoxidaseaktivität im NADH- und Isotopentest

Die Standardisierung und Eichung der Isotopenmethode von

OKUYAMA und KOBAYASHI wurde mit einem Enzympräparat aus Hundedarm durchgeführt. Bastardhunden beiderlei Geschlechts, Gewicht 14 - 32 kg, wurde in Pento-barbitalnarkose (15 - 25 mg/kg Körpergewicht i.v.) Dünndarm entnommen und sofort mit eisgekühlter, physiologischer Kochsalzlösung gereinigt. Bis zur Aufbereitung wurde der Darm bei minus 20° C gelagert. Ein Gewichtsteil Darmgewebe wurde mit 3 Gewichtsteilen Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,6) versetzt und mit dem Ultraturax homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 Minuten mit 48000 g zentrifugiert und der Überstand wie folgt aufbereitet:

1. 10 Minuten erhitzen auf 60° C
2. fraktionierte Eiweißfällung mit Ammoniumsulfat (20 - 60 % Sättigung)
3. Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Zellulose
4. 12-stündiges Dialysieren gegen 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,6

Das Enzympräparat war 132-fach gereinigt und besaß eine spezifische Aktivität von 6,6 mU/mg Eiweiß. Die Gesamtausbeute betrug 7,6 %. Das Enzym wurde in Portionen von 2 ml aufgeteilt und bei minus 20° C aufbewahrt. Die Aktivität blieb unter diesen Bedingungen über mehrere Monate konstant (KUSCHE et al. 1975).

II. 1.3.2. Extrakte zur Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität in tierischen Organen

Zur Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität in den Organen des Kaninchens wurden 5 Bastardkaninchen beiderlei Geschlechts, Gewicht 2 - 4 kg, mit Pentobarbital (25 - 35 mg/kg Körpergewicht i.v.) narkotisiert. Die Tiere wurden entblutet und Gewebe aus Lunge, Herz, Leber,

Niere, Glandula submandibularis, Glandula parotis, Glandula thyreoides und aus mehreren Stellen des Magens, Dün- und Dickdarms entnommen.

Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme mit 9 Teilen eisgekühltem 0,2 M Phosphatpuffer (pH 6,8 für die Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität im Kaninchendarm, für alle übrigen Gewebeproben wurde pH 7,6 verwendet) homogenisiert und 30 Minuten mit 48000 g in der RC2B Sorvallzentrifuge bei 0 - 4° C zentrifugiert. Die Diaminoxidaseaktivität des Überstandes wurde mit der Isotopenmethode gemessen. Die Aufbereitung und Untersuchung der Proben aus menschlichem Darm (II. 1.1.) erfolgte in gleicher Weise.

II. 1.3.3. Reinigung der Diaminoxidase aus Kaninchendünndarm

II. 1.3.3.1. Materialgewinnung

Bastardkaninchen wurde in Pentobarbitalnarkose (II.1.3.2.) der gesamte Dünndarm entnommen. Der Darm wurde in seiner ganzen Länge eröffnet, mit eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung gereinigt und bei 0 - 4° C wie folgt aufgearbeitet:

Mit einem Metallspatel wurde die Schleimhaut von der Muscularis abgeschabt. Da die Lamina muscularis nur eine sehr geringe Diaminoxidaseaktivität aufwies, wurde bei den folgenden Untersuchungen nur noch die Mucosa verwendet.

II. 1.3.3.2. Löslichkeit der intestinalen Diaminoxidase

Zur Klärung der Frage, ob die Diaminoxidase des Kaninchendarms löslich oder partikel- bzw. membrangebunden sei, wurde die abgeschabte Schleimhaut mit 3 Teilen

Phosphatpuffer (0,2 M, pH 6,8) homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 Minuten mit 2000 g oder 48000 g oder 60 Minuten mit 100 000 g zentrifugiert. Die Diaminoxidaseaktivität im jeweiligen Überstand wurde mit der Isotopenmethode bestimmt und in mU/ml angegeben.

II. 1.3.3.3. Gelfiltration über Sephadex G 50 und G 200

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung der Diaminoxidase diente der Überstand nach Zentrifugation mit 48000 g (Rohextrakt). Anteile von je 10 ml des gesamten Überstandes wurden über Sephadex G 50 Säulen (2 x 30 cm, äquilibriert mit Phosphatpuffer, 0,2 M, pH 6,8) getrennt. Das Erscheinen der Proteine im Effluat wurde mit dem Ultravioletabsorptions-Spektrometer LKS 8300 Uvicord II kontinuierlich bei 280 nm gemessen. Die Fraktionen des Proteingipfels, die in 4-5 ml Portionen gesammelt wurden und ein Gesamtvolumen von ca. 15 ml umfaßten, wurden vereinigt und zur Weiterverarbeitung verwendet. In diesem Effluat konnte die Enzymaktivität sowohl mit dem Isotopentest als auch mit der NADH-Methode unter Verwendung verschiedener Substrate gemessen werden. Die Vorreinigung der Gewebsextrakte über Sephadex G 50 stellte dabei eine Vorbedingung für die Verwendung des NADH-Tests dar (LORENZ et al. 1968).

Die weitere Anreicherung der Diaminoxidase und die Abtrennung einer löslichen Monoaminoxidase erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex G 200 (KUSCHE et al. 1974). Jeweils 5 ml des gesamten Sephadex G 50-Filtrates wurden einer erneuten Gelfiltration an Sephadex G 200-Säulen (2 x 60 cm, äquilibriert mit 0,2 M Phosphatpuffer, pH 6,8) unterzogen. Das Effluat wurde in 4-5 ml Fraktionen gesammelt und das Erscheinen der Proteine, wie oben angegeben, kontinuierlich verfolgt (Abb. 14). Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt.

II. 1.4. Reagentien und Pharmaka

II. 1.4.1. für den Isotopentest

Die Präzision des Isotopentests hängt stark von der genauen Einhaltung der Zubereitungsvorschriften der einzelnen Reagentien ab. Die Herstellung der Lösungen wird daher entsprechend den Empfehlungen von BERGMEIER (1970) sehr genau beschrieben. Soweit nicht anders angegeben, wurden Reagentien mit dem Reinheitsgrad "zur Analyse" (p.a.) und bidestilliertes Wasser verwendet.

Phosphatpuffer:

0,2 M, pH 6,8 bzw. 7,6 : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4 (Merck)

Substratlösung:

120,7 mg Putrescin-dihydrochlorid (Fluka) wurden in 50 ml Phosphatpuffer gelöst. Zu 50 ml dieser Lösung wurde 1 Ampulle Putrescin-1,4- ^{14}C -Dihydrochlorid zugegeben (Radiochemisches Zentrum Amersham): Spezifische Aktivität 17,8 mCi / mM, 50 μCi /Ampulle entsprechend 2,8 μM Putrescin. Die spezifische Aktivität der Substratlösung betrug 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml} = 2,2 \times 10^6$ dpm/ml. Die Menge des radioaktiven ^{14}C -Putrescin betrug nur 1/270 des unmarkierten Putrescins. Sie konnte deshalb bei der Berechnung der Endkonzentration des Putrescins im Ansatz vernachlässigt werden. Die Substratlösung wurde bei minus 20° C aufbewahrt und blieb über Monate stabil.

Perchlorsäure:

7 ml 70 % HClO_4 ($\approx 11,9$ M, Merck) wurden mit bidestilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Da der endgültige pH-Wert der wässrigen Phase des Extraktionsgemisches

auch von der Konzentration der Perchlorsäure abhängt, müssen die angegebenen Mengen genau eingehalten werden.

"Stark alkalischer Puffer":

Es wurde eine bei Raumtemperatur gesättigte Bikarbonatlösung hergestellt, wobei darauf geachtet wurde, daß in der Vorratsflasche stets ein Niederschlag an festem Na HCO_3 vorhanden war. 200 ml des klaren Überstandes wurden jeweils entnommen und mit 2 n NaOH auf pH 12,2 eingestellt. Der pH-Wert wurde mit einer Glaselektrode gemessen.

Toluol-PPO:

1000 ml Toluol wurden 3,5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO, Merck) zugesetzt.

^{14}C -Toluol:

Standardlösung (Buchler) $7,76 \times 10^5$ dpm/ml

II. 1.4.2. für den NADH-Test

Phosphatpuffer: 0,2 M, pH 6,8 bzw. 7,6 (siehe II. 1.4.1.)

α -Ketoglutarat (171 mM):

97,5 mg Na_2 α -Ketoglutarat wurden in 3 ml bidestilliertem Wasser aufgelöst oder 75 mg α -Ketoglutarsäure wurden in 1 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 1 n Natronlauge auf pH 6,8 bzw. 7,6 eingestellt und mit aqua bidest. auf 3 ml aufgefüllt.

Reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid:

(β -NADH, 5,7 mM, Boehringer Mannheim):

12,1 mg NADH Na_2 wurden in 3 ml 1 % NaHCO_3 -Lösung gelöst.

Substratlösungen:

Putrescin (30 mM): 14,5 mg Putrescin-Dihydrochlorid wurden in 3 ml Phosphatpuffer gelöst.

Serotonin (30 mM): 26,3 mg Serotoninhydrogenmaleinat wurden in 3 ml Phosphatpuffer gelöst.

Histamin (3 mM): 1,7 mg Histamin-Dihydrochlorid wurden in 3 ml Phosphatpuffer gelöst.

Glutamatdehydrogenase:

GLDH, 10 mg/ml, Boehringer Mannheim. Soweit notwendig, wurde die Stammlösung mit 50 % Glycerin verdünnt, bis eine spezifische Enzymaktivität von 3 U/0,05 ml erreicht wurde.

Die Substratlösungen wurden bei minus 20° C gelagert und blieben über mehrere Monate stabil. Die NADH-Lösung und die α -Ketoglutarlösung wurden wöchentlich frisch hergestellt und bei 0 - 4° C aufbewahrt. Die GLDH-Lösung zeigte bei Lagerung im Kühlschrank (0 - 4° C) innerhalb eines halben Jahres keinen signifikanten Aktivitätsverlust.

II. 1.4.3. für die Histaminbestimmung

Histamindihydrochlorid (Fluka), o-Phthaldialdehyd Purissimum (umkristalisiert in Petroläther, Siedepunkt zwischen 40 - 60° C), Methanol (Fluka), n-Heptan (Uvasol^R), n-Butanol, HClO₄, HCl und NaCl (Suprapur^R), NaOH (Selectipur^R), (alle von Merck, Darmstadt), Dowex 50 W X 8, H⁺, Korngröße 200 - 400 (Serva).

II. 1.4.4. für die Narkose

Die Operationen am Menschen wurden in Intubationsnarkose mit Thiopentaleinleitung, Suxamethonium, Dimethyltubocurarin, Halothan und Lachgas durchgeführt. Die Hunde und Kaninchen wurden mit Pentobarbital (Nembutal^R, 15 - 35 mg/kg Körpergewicht i.v.) narkotisiert.

II. 1.4.5. für die in vitro-Hemmversuche

Aminoguanidinsulphat (Monohydrat, Schuchard München) und Pargylin (Abbot): Die Hemmstoffe wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in Phosphatpuffer (0,2 M, pH 6,8 bzw. 7,6) gelöst.

II. 1.4.6. für die Versuche bei intestinaler Ischämie

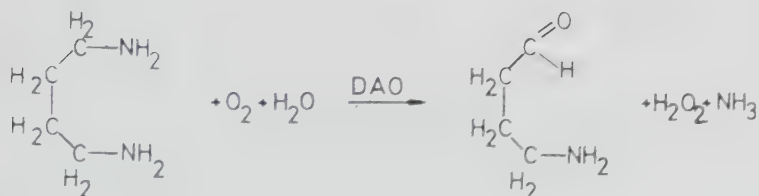
Zur Desinfektion der Haut wurde Phenylhydrargum (Merfen^R) benutzt. Der Darm wurde mit Ringerlösung (Universitätsapotheke, 312 mÄquival./l, pH 6,0) perfundiert. Für die in vivo-Hemmversuche wurde Aminoguanidinsulfat (Monohydrat, Schuchard München), gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, benutzt.

II. 2. Methodik

II. 2.1. Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität

II. 2.1.1. Prinzip des Isotopentests (^{14}C -Putrescintest)

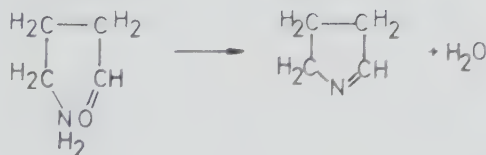
Das Diamin Putrescin (1,4 - Diaminobutan) wird unter der katalytischen Wirkung der Diaminoxidase oxidativ desaminiert (Reaktion I):



Putrescin

γ -Aminobutyraldehyd

Der entstehende γ -Aminobutyraldehyd wird in einer spontanen, nicht enzymatisch gesteuerten Reaktion quantitativ in das cyclische Δ_1 -Pyrrolin und dessen Polymere umgewandelt (Reaktion II):



γ -Aminobutyraldehyd

Δ_1 -Pyrrolin

Das sehr gut wasserlösliche Putrescin löst sich im Gegensatz zu dem mehr hydrophoben cyclischen Δ_1 -Pyrrolin und dessen Polymeren nur schlecht in organischen

Lösungsmitteln. Die Reaktionsprodukte der enzymatischen Reaktion, das cyclische β -Pyrrolin und seine Polymere, lassen sich deshalb mit Hilfe des organischen Lösungsmittels Toluol leicht aus der wässrigen Phase des Reaktionsansatzes extrahieren und somit von Putrescin trennen.

Im ^{14}C -Putrescintest wird in 1- und 4-Stellung radioaktiv markiertes Putrescin verwendet. Die Menge Radioaktivität, die von der wässrigen Phase in die organische Phase extrahiert wird, ist ein Maß für die Diaminoxidaseaktivität.

II. 2.1.2. Prinzip des NADH-Tests

Bei der oxidativen Desaminierung von Aminen durch die Diaminoxidase entsteht Ammoniak (siehe Reaktion I, II. 2.1.1.). Mit Hilfe einer Indikatorreaktion, die von dem Enzym Glutamatdehydrogenase katalysiert wird, kann die Menge des entstandenen Ammoniaks bestimmt werden (Reaktion III):

$\text{NH}_3 + \alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{GLDH}} \text{Glutamat} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt weit auf der rechten Seite:

$$K = \frac{[\alpha\text{-Ketoglutarat}]}{[\text{Glutamat}]} \frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}^+]} \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{O}]} \frac{[\text{NH}_3]}{[\text{H}_2\text{O}]} = 1,8 \times 10^{-13}$$

Der Ammoniak wird somit praktisch quantitativ unter äquimolarer Oxidation von NADH auf α -Ketoglutarat übertragen.

NADH besitzt ein vom NAD^+ deutlich unterschiedliches Absorptionsspektrum; seine Oxidation läßt sich deshalb photometrisch messen. Die Abnahme der Extinktion, die mit den herkömmlichen Photometern bei 334, 340 oder 366 nm

gemessen werden kann, ist ein Maß für die Diaminoxidaseaktivität. Die Umwandlung von 1 M NADH + H⁺ zu NAD⁺ entspricht dabei dem Umsatz von 1 M Substrat der Diaminoxidase.

II. 2.1.3. Durchführung des Isotopentests (Abb. 1)

II. 2.1.3.1. Inkubation

In Zentrifugenröhrchen, die durch Glasschliffstopfen verschließbar waren, wurden nacheinander 0,5 ml Phosphatpuffer und 0,2 ml Enzymlösung pipettiert. Durch Zugabe von 0,05 ml Substratlösung und sofortiger Durchmischung wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubation erfolgte in einem Thermostablock (Mensch) bei 37° C und Luftatmosphäre. Nach einer bestimmten Inkubationszeit (z. B. 15, 30, 45 min) wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,2 ml Perchlorsäure gestoppt.

II. 2.1.3.2. Extraktion

1 ml des stark alkalischen Puffers (pH 12,2) und 5 ml Toluol-PPG wurden dem Inkubationsansatz nach Stopp der Reaktion zugegeben, die Zentrifugenröhrchen mit den Glasschliffstopfen verschlossen und 4 Minuten durchgeschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch zur Trennung der organischen und der wässrigen Phase 2 Minuten zentrifugiert und die wässrige Phase bei minus 30° C ausgefroren. Die bei dieser Temperatur noch flüssige organische Phase konnte dann leicht dekantiert werden.

II. 2.1.3.3. Szintillationszählung

Zur Szintillationszählung wurden die 5,0 ml der organischen Phase und 5,0 ml Toluol-PPO in Polyaethylen-Szintillationsröhrchen (HORMUTH-VETTER) gefüllt und die Radioaktivität als counts per minute (cpm) im Szintillationszähler (Modell Packard, Tricarb 3380) mit dem im Gerät fest eingestellten ^{14}C -Kanal gemessen. Die Fehlergrenze betrug 1,5 % (2S.D.). Eine Backgroundaktivität von 30 counts per minute wurde automatisch substrahiert. Zur Quench-Kontrolle wurde das externe Standard-Kanal-Verhältnis mit Hilfe eines hoch energetischen Standards bestimmt. Zur weiteren Quenchkontrolle wurden unterschiedliche Mengen ^{14}C -Toluol der Extraktionslösung zugegeben. Dieses Gemisch diente als innerer Standard, an Stelle des "echten" inneren Standards von ^{14}C - Δ_1 -Pyrrolin, das im Handel nicht erhältlich und somit nicht verwendbar ist. Die Quenchkontrolle wurde auf 2 verschiedene Arten durchgeführt:

1. 0,05 ml ^{14}C -Toluol (entsprechend 38800 dpm) wurde in den Inkubationsansatz (0 min Inkubation) unmittelbar vor der Extraktion gegeben.
2. Dieselbe Menge ^{14}C -Toluol wurde erst nach dem Extraktionsverfahren unmittelbar vor der Zählung in die Szintillationsröhrchen gegeben.

II. 2.1.3.4. Leerwerte und Reaktionsgeschwindigkeit

Um sicher zu gehen, daß die extrahierten radioaktiven Substanzen Produkte der enzymatischen Reaktionen waren, wurden 3 Leerwerte bestimmt:

1. Kochwert: Durch 10 min. Kochen inaktiviertes Enzym wurde wie aktives Enzym inkubiert.

	Menge	Zusammensetzung des Ansatzes
1. Inkubationsverfahren:		
Nacheinander in Zentrifugengläser pipettieren:		
Phosphatpuffer	0,5 ml	0,2 M
Enzym	0,2 ml	
Mischen, auf 37° C bringen und die Reaktion starten mit Substrat:		
¹⁴ C-Putrescin und unmarkiertes Putrescin	0,05 ml	0,001 M ≈ 10 ⁵ dpm
Mischen und nach definierten In- kubationszeiten (0, 15, 30, 45 min), die Reaktion stoppen mit Perchlor- säure.		
	0,2 ml	0,4 M
2. Extraktionsverfahren:		
Nacheinander in die Zentrifugen- gläser pipettieren:		
Stark alkalischer Puffer (pH 12,2)	1,0 ml	pH 10,0 [±] 0,1
Toluol-PPO (0,35 %)	5,0 ml	
Die Zentrifugengläser werden mit Glasstopfen verschlossen und 4 min. geschüttelt; um eine Trennung von wässriger Phase und organischer Phase zu erzielen, wird kurz zen- trifugiert. Bei - 30° C wird die wässrige Phase im Äthanolbad ein- gefroren.		
3. Szintillationszählung:		
In spezielle, zur Szintillations- zählung geeignete Polyäthylen- fläschchen werden folgende Lö- sungen gegeben:		
Toluol-PPO (0,35 %)	5,0 ml	
Die organische Phase wird von der tiefgefrorenen wässrigen Phase dekantiert.	5,0 ml	
Die Polyäthylenfläschchen werden verschlossen und in den Szintillationszähler gebracht.		

Abb. 1: Inkubations-, Extraktions- und Testverfahren zur Bestimmung von Diaminoxidase-Aktivität im Isotopentest (Substrat: ¹⁴C-Putrescin und unmarkiertes Putrescin)

2. Enzymleerwert: Das Enzym wurde vor Zugabe der Substratlösung mit Perchlorsäure inaktiviert (0 min Inkubation).

3. Reagentienleerwert: Das Enzym wurde durch die gleiche Menge Phosphatpuffer ersetzt.

Die Leerwerte zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Reaktionsgeschwindigkeit:

Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$v = \frac{\text{Testwert (cpm)} - \text{Leerwert (cpm)}}{\text{Reaktionszeit (min)}} \quad [\text{cpm/min}]$$

Nach Eichung des ^{14}C -Tests mit dem NADH-Test konnte die Diaminoxidaseaktivität von cpm/min in mU umgerechnet werden.

II. 2.1.4. Durchführung des NADH-Tests (Abb. 2)

II. 2.1.4.1. Vorinkubation

In Quarzglasküvetten (QS, Hellma) wurden nacheinander 1,65 - 2,55 ml Phosphatpuffer, 0,05 ml GLDH, 0,10 ml α -Ketoglutarat, 0,10 ml $\text{NADH} + \text{H}^+$ und 0,10-1,00 ml Enzym (Enzym + Puffer = 2,65 ml) pipettiert und durchmischt. Dann wurden die Küvetten im Küvettenhalter auf 37°C erwärmt. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,10 ml Substratlösung gestartet. Durch die 10 min. Vorinkubation wurde das Reaktionsgemisch auf die gewünschte Temperatur eingestellt und der primär im Ansatz vorhandene Ammoniak verbraucht.

II. 2.1.4.2. Messung

Nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von 0,10 ml Substratlösung wurde der Meßansatz bei 37° C und Raumluft inkubiert. Die Extinktionsabnahme wurde im Eppendorf-Photometer bei 340 oder 366 nm gemessen. Die Küvetten (Schichtdicke 1,000 cm) wurden automatisch alle 30 sec gewechselt und die Extinktionswerte mit einem Laborschreiber (Philipps) je nach Reaktionsgeschwindigkeit 30 min bis 2 Stunden lang fortlaufend registriert.

Zum Ausschluß einer unspezifischen Ammoniakbildung, die nicht auf die Enzymreaktion zurückzuführen war, wurden 2 Leerwerte bestimmt:

Enzymleerwert: Anstelle der Substratlösung wurde die gleiche Menge Phosphatpuffer zugegeben.

Reagentienleerwert: Das Enzym wurde durch die entsprechende Menge Phosphatpuffer ersetzt.

II. 2.1.4.3. Reaktionsgeschwindigkeit

Die Reaktionsgeschwindigkeit (V) wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$V = \frac{E_{\text{Testansatz}} - E_{\text{Leerwert}} - E_{\text{Reagentienleerwert}}}{\text{Reaktionszeit (min)}} \left[\Delta E / \text{min} \right]$$

Die Umrechnung der Reaktionsgeschwindigkeit in die Diaminoxidaseaktivität (mU/ml) erfolgte in Abhängigkeit von der Wellenlänge durch Multiplikation mit einem Faktor:

Wellenlänge:	334 nm	340 nm	366 nm
mU / Ansatz:	508,6 x $\frac{\Delta E}{\text{min}}$	485,9 x $\frac{\Delta E}{\text{min}}$	909 x $\frac{\Delta E}{\text{min}}$

Nacheinander in Küvetten pipettieren	Menge	Endkonzentration im Ansatz
Phosphatpuffer	1,65-2,55 ml	ca. 0,2 M
GLDH	0,05 ml	ca. 1,0 U/ml
α -Ketoglutarat	0,10 ml	5,7 mM
NADH	0,10 ml	0,19 mM
Enzym	0,1 - 1,00 ml	Enzym + Puffer = 2,65 ml

Mischen und 10 min. stehen lassen;
der im Inkubationsansatz vorhandene
Ammoniak reagiert während dieser
Zeit ab und die Probe wird auf 37°C
temperiert.

Substrat: z. b. Putrescin 0,10 ml 1 mM

Mischen und den Extinktionsabfall
am Photometer mit Schreiber re-
gistrieren. Automatischer Küvet-
tenwechsel alle 30 sec.

Endvolumen 3,0 ml

Abb. 2: Inkubationsansatz zur Bestimmung der Diaminox-
dase-Aktivität im NADH-Test

II. 2.2. Bestimmung der Histaminkonzentrationen im Gewebe und im Perfusat

Die Histaminkonzentration der Kaninchendarmproben wurde nach der Methode von LORENZ et al. (1971) gemessen. Das Homogenat (siehe II. 1.3.2.) wurde mit 4 N HClO_4 enteiweißt. Die chemische Isolierung des Histamins erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 W X 8. Nach Kondensation mit o-Phthalaldehyd wurde die Menge des Amins fluorometrisch gemessen. Die Spezifität der Methode bei Untersuchungen der Histaminkonzentration am Kaninchendarm wurde durch Bestimmung der Fluoreszenzspektren, Übereinstimmung von fluorometrischer Methode mit biologischem Test sowie Prüfung des letzteren mit spezifischen H_1 -Rezeptorantagonisten (Antazolin) nachgewiesen.

Für die Bestimmung des Histamingehaltes im Perfusat wurde die von LORENZ et al. (1972) für Plasma entwickelte Methode angewendet. Die Perchlorsäureextrakte wurden auf pH 6,5 eingestellt und an Dowex 50 W X 8 chromatographiert. Nach Extraktion des Eluats mit n-Butanol (SHORE et al. 1959) wurde das isolierte Histamin mit 0,05 %-igem Phthalaldehyd versetzt und das entstehende Kondensat fluorometrisch gemessen. Die Spezifität dieser Bestimmungsmethode wurde ebenfalls entsprechend den Forderungen von LORENZ et al. (1970) anhand der Fluoreszenzspektren, Dünnschichtchromatographie und Abbau durch Histamin-Methyl-Transferase und Diaminoxidase nachgewiesen. Die Histaminkonzentration wurde in μg Histamin-Dihydrochlorid / g Gewebe bzw. ml Perfusat angegeben.

II. 2.3. Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in Rohextrakten erfolgte nach der Biuret-Methode (WEICHSELBAUM 1946) und in gereinigten Enzympräparaten (Protein-

gehalt weniger als 1 mg/kg) nach der Methode von LOWRY et al. (1951).

II. 2.4. Intestinale Ischämie

Die Arteria mesenterica superior versorgt beim Menschen das gesamte Jejunum, Ileum, Caecum, Colon ascendens und Colon transversum bis zur Flexura lienalis. Über die Arteriae pancreatico-duodenales besteht ein Kollateralkreislauf zum Truncus coeliacus und über die Arteria colica media zur Arteria mesenterica inferior. Nach COHNHEIM (1872) ist die Arteria mesenterica superior eine funktionelle Endarterie, bei einem akuten Verschuß kommt es deshalb zu einer haemorrhagischen Darminfarzierung. Das Versorgungsgebiet der Arterie beim Kaninchen ermittelten wir durch Injektion des Farbstoffes Indigocarmin (ROSS 1972) in die Arterie. Duodenum und Pankreas wurden bei dieser Spezies nicht angefärbt und gehörten somit nicht zum Versorgungsgebiet der Arteria mesenterica superior.

Der akute temporäre Verschuß der Arteria mesenterica superior und die anschließende Revaskularisation führten beim Kaninchen zum kontinuierlichen Blutdruckabfall und Tod im Herz-Kreislaufstillstand (Abb. 3).

II. 2.4.1. Perfusionsmodell

Wir untersuchten den Einfluß einer Perfusion des Gefäßbettes des ischämischen Darmes vor Wiedereröffnung der Durchblutung der Arteria mesenterica auf die Überlebenszeit bei Kaninchen.

II. 2.4.1.1. Operationstechnik

Die Kaninchen wurden mit Pentobarbital (25-35 mg/kg Körpergewicht i.v.) narkotisiert. Damit die Tiere während der Versuche nicht auskühlten, wurde ihre Körpertemperatur auf einem beheizten Operationstisch konstant gehalten. Die zentrale Körpertemperatur wurde fortlaufend mit einer Ösophagus- oder Rektalsonde kontrolliert. Zur Messung des arteriellen Blutdrucks wurde die Arteria femoralis freipräpariert und ein Plastikkatheter durch die Arterie in die Aorta abdominalis vorgeschoben.

Nach Desinfektion der Bauchdecken mit Phenylhydrargum (Merfen^R) wurde eine mediane Oberbauchlaparotomie durchgeführt und die Arteria mesenterica superior in ihrem Anfangsteil freipräpariert. Die Arterie wurde 1 - 2 cm nach ihrem Abgang aus der Aorta mit einer Klemme verschlossen (Beginn der intestinalen Ischämie). Unmittelbar distal der Verschlußstelle wurde ein Kehrsches T-Drain eingeführt. Der lange Schenkel des T-Drains wurde aus der Bauchhöhle herausgeleitet. Anschließend wurde die Pfortader freipräpariert und 5 cm vor dem Leberhilus ebenfalls ein Kehrsches T-Drain eingeführt. Hierbei mußte auf Grund der starken Blutungsgefahr die Vena lienalis unterbunden werden. Der lange Schenkel des T-Drains wurde ebenfalls aus der Bauchhöhle herausgeleitet. Nach der Operation wurde die Bauchwunde mit Tuchklemmen verschlossen und mit sterilen Tüchern abgedeckt.

Während der Ischämie waren sowohl der zuführende kurze als auch der lange Schenkel des arteriellen T-Drains verschlossen. Am portalen T-Drain wurde dagegen nur der lange Schenkel abgeklemmt. Nach 90 minütiger Ischämie wurden bei 8 Versuchstieren 500 ml 37° C warmer Ringerlösung mit einem Druck von 60 cm H₂O

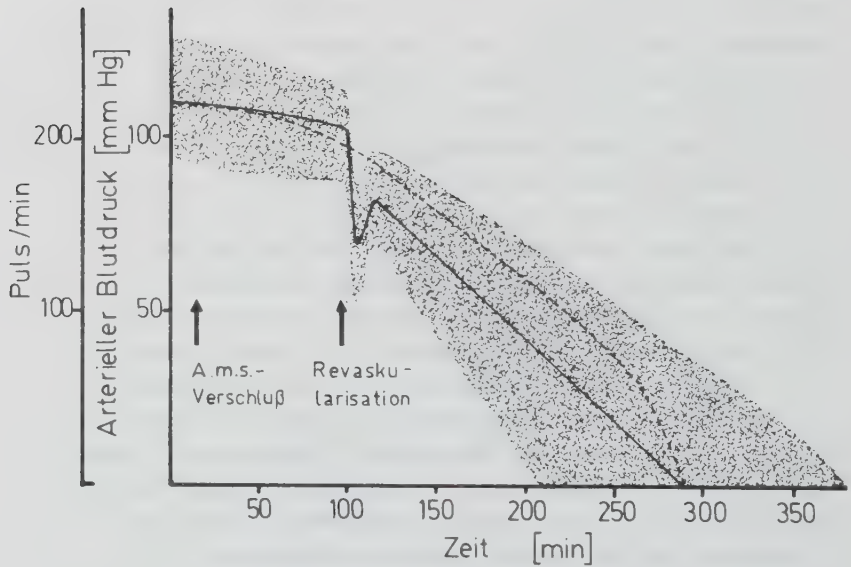


Abb. 3: Beeinflussung von Blutdruck, Puls und Körpertemperatur beim Kaninchen durch den temporären Verschuß der Arteria mesenterica superior und Revaskularisation

Werte von 10 Versuchstieren.

- mittlerer arterieller Blutdruck in der distalen Aorta,
-  Standardabweichung (S.D.) des arteriellen Druckes
- - - - - mittlere Pulsfrequenz

(Schwerkraftperfusion) durch den langen Schenkel des T-Drains in die Arteria mesenterica superior geleitet und der Darm perfundiert. Das Perfusat wurde durch den langen Schenkel des portalen T-Drains nach außen abgeleitet (Abb. 4). Die Pfortader war dabei zur Leber hin verschlossen. Die Perfusionszeit betrug durchschnittlich 15 min.

Im Anschluß an die Perfusion wurden die langen Schenkel der T-Drains verschlossen. Die Arteria mesenterica superior und die Pfortader wurden wieder eröffnet und die Überlebenszeit nach der Revaskularisation gemessen.

Bei 8 Kontrolltieren wurde die Durchblutung der Arteria mesenterica superior nach 90 minütiger Ischämie direkt, ohne Perfusion des Darmes, wieder eröffnet.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Operationsstress, Narkose und anderen Faktoren auf die Überlebenszeit wurden 5 Tiere scheinoperiert. Dabei wurde die Operation in der oben beschriebenen Weise durchgeführt, die Arteria mesenterica superior aber nur für die 5 Minuten verschlossen, die zum Einführen des T-Drains erforderlich waren. Die verschiedenen Versuche (Perfusion, reine Ischämie, scheinoperierte Tiere) erfolgten in randomisierter Reihenfolge.

Da die Operationstechnik, insbesondere das Einführen des T-Drains in die Pfortader, relativ schwierig war, wurden mehrere Vorversuche durchgeführt. Hierbei wurden auch 90 Minuten als die günstigste Ischämiezeit ermittelt. Nach längerer Ischämie (105 und 120 min) verstarben die Tiere meist innerhalb weniger Minuten, nach nur 60 minütiger Ischämie überlebten die Tiere so lange, daß andere unspezifische Faktoren wie Operationsstress, Narkose und beginnende Peritonitis zunehmenden Einfluß auf die Überlebenszeit erlangten.

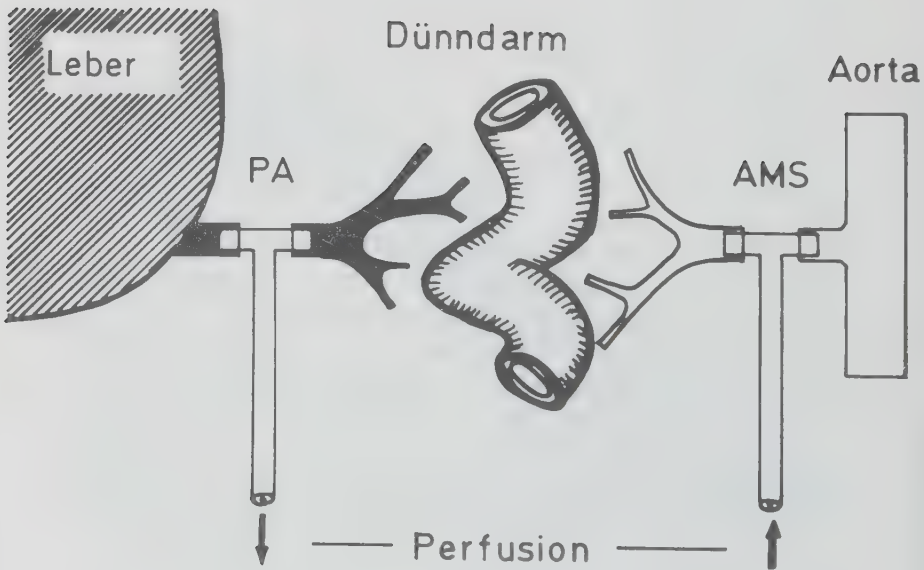


Abb. 4: Schema der Perfusion des Versorgungsgebietes der Arteria mesenterica superior

AMS: Arteria mesenterica superior, PA: Pfortader, die Pfeile geben die Richtung der Perfusion an, Ausführung des Verschlusses der Arteria mesenterica superior und Revaskularisation siehe Text; sonstige Bedingungen siehe Methodik.

II. 2.4.1.2. Messung des Blutdrucks und des Pulses

Der arterielle Blutdruck wurde während der gesamten Versuchsdauer fortlaufend mit einem Statham-Druckwandler über den in die Aorta vorgeschobenen Femoral-katheter gemessen. Die Werte wurden über eine Meßbrücke mit einem Hellige Laborschreiber aufgezeichnet. Den mittleren arteriellen Druck errechneten wir nach BURTON (1969):

$$\frac{\text{systolischer Druck} + 2 \times \text{diastolischer Druck}}{3} = \text{mitt-}$$

lerer arterieller Druck

Die Pulsfrequenz wurde oszillographisch registriert. Der Tod der Versuchstiere wurde durch Nulllinie der Pulskurve festgestellt. Bei 5 Versuchstieren wurde der Pfortaderdruck kontinuierlich mit einem Statham-Druckwandler gemessen. Er blieb während der Ischämie nahezu konstant.

II. 2.4.1.3. Untersuchungen des Perfusats

Das Perfusat wurde aus dem portalen T-Drain abgeleitet, der während dieser Zeit zur Leber hin verschlossen war, und in 100 ml Portionen in eisgekühlten Glasbechern aufgefangen. Das anfangs blutige Perfusat wurde in der 4. und 5. Portion klar. Die fünfte Portion umfaßte nur 20 - 60 ml (durchschnittlich 50 ml), der Rest des Perfusats war vom ischämischen Darm aufgenommen worden. 20 ml jeder Portion wurden zur Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität mit der Isotopenmethode entnommen. Je 2 Proben a 6 ml wurden mit 2 ml 2 N Perchlorsäure enteiweißt und der Histamingehalt bestimmt (II. 2.2.).

II. 2.4.2. Untersuchung des Einflusses von Aminoguanidin auf die Überlebenszeit nach intestinaler Ischämie

Die unter II. 2.4.1. beschriebene Operationstechnik wurde für diese Versuche vereinfacht. Die Arteria mesenterica superior wurde in üblicher Weise freipräpariert und mit einer Klemme verschlossen. Die Einführung des T-Drains erübrigte sich, da eine Perfusion nicht durchgeführt werden sollte. Nach 90 min. Ischämie wurde der Darm revaskularisiert und die Überlebenszeit wie oben gemessen.

In einer Versuchsreihe wurden 25 Tiere operiert. Die Versuche wurden in 14 Tagen in randomisierter Reihenfolge durchgeführt. 10 Tieren wurden 25 mg Aminoguanidin pro kg Körpergewicht in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung 1 Stunde vor Beginn der intestinalen Ischämie in die Ohrvene injiziert. 10 Vergleichstiere bekamen statt dessen nur 2 ml reine physiologische Kochsalzlösung injiziert. 5 Kaninchen wurden scheinoperiert. Diese erhielten ebenfalls 25 mg/kg Aminoguanidin, der Bauch wurde eröffnet, die Arteria mesenterica superior freipräpariert und umschlungen, aber nicht verschlossen. Die Tiere wurden 6 Stunden auf dem Operationstisch belassen, dann wurde die Laparotomiewunde mit einer einschichtigen, fortlaufenden Naht verschlossen und die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden 30 Kaninchen innerhalb eines Monats operiert. 6 Gruppen á 5 Versuchstiere wurden 0, 10, 25, 30, 50 und 100 mg Aminoguanidin pro kg Körpergewicht 1 Stunde vor Beginn der intestinalen Ischämie in die Ohrvene injiziert. Die Zuordnung von Dosis Tier und Tag erfolgte nach dem lateinischen Quadrat (MITTENECKER 1964).

II. 2.4.3. Diaminoxidaseaktivität und Histamingehalt im Kaninchendarm bei intestinaler Ischämie, Perfusion und Revaskularisation der Arteria mesenterica superior

5 Kaninchen, die nach der in II. 2.4.1. beschriebenen Weise operiert wurden, wurde Gewebe aus der 2. Jejunumschlinge zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

Die 1. Probe vor Verschuß der Arteria mesenterica superior, die 2. Probe am Ende der 90 min. Ischämie, die 3. Probe nach der Perfusion und die 4. Probe 10 Minuten nach der Revaskularisation. Die Proben wurden, wie in II. 1.3.2. beschrieben, aufbereitet und die Diaminoxidaseaktivität mit dem Isotopentest gemessen. Die Histaminkonzentration wurde nach der Methode von LORENZ et al. (1971) bestimmt (II. 2.2.).

Weiterhin entnahmen wir 10 Versuchstieren, die nach der vereinfachten Operationstechnik operiert wurden (II. 2.4.2.), je eine Gewebeprobe aus der 2. Jejunumschlinge vor Verschuß der Arteria mesenterica superior, am Ende der Ischämie und 10 Minuten nach der Revaskularisation und bestimmten die Diaminoxidaseaktivität mit der Isotopenmethode.

II. 2.4.4. Nachweis der intestinalen Ischämie

⁴ Beim akuten Verschuß der Arteria mesenterica superior wird auf Grund der anatomischen und funktionellen Bedingungen ein großer Teil des Darmes von der Durchblutung ausgeschlossen (ROSS 1972). Die Folgen sind eine hypoxische Zellschädigung und Freisetzung von vasoaktiven Substanzen, die bei Revaskularisation des Darmes zum Kreislaufkollaps im gesamten Organismus führen.

II. 2.4.4.1. Zum histologischen Nachweis der Zellschädigung nach intestinaler Ischämie wurde 10 Kaninchen (5 mit Darmischämie, 5 scheinoperiert), nach Revaskularisation Gewebe aus dem Jejunum entnommen. Die Gewebsstücke wurden mit 4 % Formaldehyd fixiert und anschließend im Autotechnikon (Firma Technikon) in Paraplast eingebettet. Die 5 μ dicken Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin nach der Methode von ROMEIS (1968) angefärbt.

II. 2.4.4.2. Als weiteres Kriterium zum Nachweis der intestinalen Ischämie wurde die Sauerstoffspannung des Darmgewebes polarographisch mit einer Platin-Oberflächenelektrode nach KESSLER und LÜBBERS (1967) bestimmt. Die Messungen wurden an 6 Kaninchen unmittelbar vor dem Verschuß der Arteria mesenterica superior, 15 und 70 min nach dem Verschuß (Modell ohne Perfusion, s. Kap. II. 2.4.2.) und 10 min nach Revaskularisation auf der Serosa und Mucosa im Bereich der 2. Jejunalschlinge durchgeführt. Für die Messung auf der Mucosa wurde der Darm in 3 - 4 cm Länge gegenüber dem Mesenterialansatz eröffnet, die Schleimhaut vorsichtig von Blut und Schleimresten gesäubert und die Elektrode aufgesetzt.

Die Platinelektrode enthielt 18 Einzelmeßdrähte (Durchmesser des Einzelmeßdrahtes 15 μ). Die Signale wurden integriert abgeleitet. Der Einzugsbereich des einzelnen Meßdrahtes lag bei 80 μ . Die Elektrode wurde mit Stickstoff (reinst, Messer Griesheim) und Raumluft (20,4 % O₂) bei aktueller Temperatur des Darmes unter Berücksichtigung des Barometerdruckes geeicht.

Die Messungen in den verschiedenen Versuchsphasen wurden an 8 - 15 verschiedenen Stellen im Abstand von

0,5 cm durchgeführt. Das arithmetische Mittel der erhaltenen Werte ergab den mittleren Sauerstoffdruck (pO_2) des Gewebes, ausgedrückt in Torr.

II. 2.5. Statistische Berechnungen

Für die Errechnung der Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichung (S.D.), Student-t-Test etc. wurde ein Olivetti Tischcomputer Programma 102 benutzt. Bei der Berechnung der Überlebenszeit wurde neben dem arithmetischen Mittel auch das harmonische Mittel (CAVALLI-SFORZA 1972) verwendet.

III. Ergebnisse

III. 1. Standardisierung und Eichung der Isotopen- methode mit dem NADH-Test

III. 1.1. Inkubationsbedingungen

Die günstigsten Inkubationsbedingungen der Diaminoxidase variieren für verschiedene Organe und Spezies. Bei der Ausarbeitung der Methode verwendeten wir gereinigte Hundedarmdiaminoxidase (II. 1.3.1.).

III. 1.1.1. Unsere Untersuchungen über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Diaminoxidaseaktivität zeigten, daß die Aktivität zwischen pH 7,2 und 7,7 konstant war und außerhalb dieses Bereiches wieder abnahm (Abb. 5). Bei den weiteren Messungen wählten wir pH 7,6, da dieser Wert innerhalb des Plateaus lag, gleichzeitig aber mit dem pH-Optimum von Diaminoxidasepräparaten aus anderen Spezies recht gut übereinstimmte.

Eine Ausnahme bildete die Diaminoxidase des Kaninchendarmes, die mit Putrescin als Substrat ein pH-Optimum bei pH 6,8 aufwies (siehe III. 4.3.2.).

III. 1.1.2. Die Untersuchung verschiedener Phosphatpufferkonzentrationen ergab als günstigsten Wert 0,2 M.

III. 1.1.3. Das Substratoptimum für Putrescin (NADH- und Isotopentest) lag bei 1 mM. Höhere Konzentrationen hemmten das Enzym (Substrathemmung) (Abb. 6). Die Michaeliskonstante für Putrescin war 1×10^{-4} M. Dieser Wert wurde sowohl mit dem Isotopen- als auch mit dem NADH-Test ermittelt.

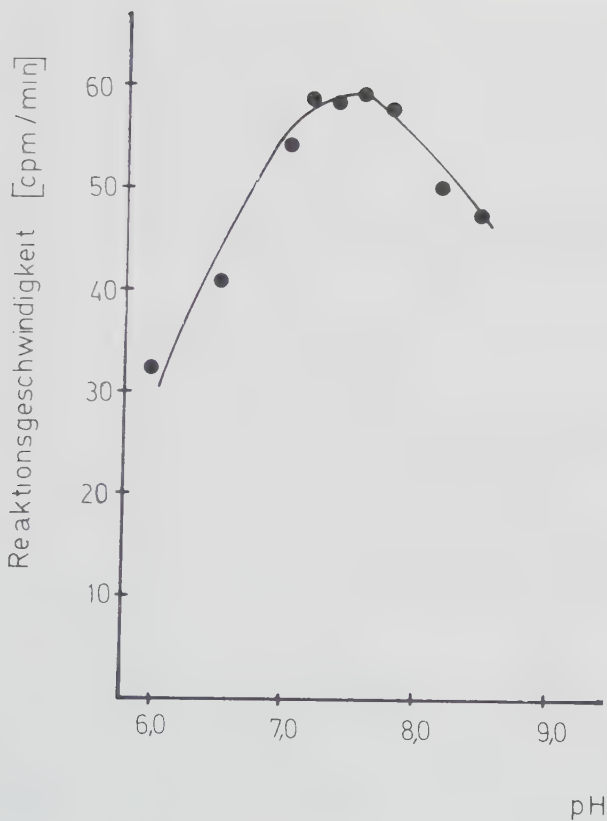


Abb. 5: pH-Abhängigkeit der Diaminoxidase des Hundedarmes.

Bestimmung der Enzymaktivität mit dem Isotopen-test. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Weitere Bedingungen siehe Material und Methodik.

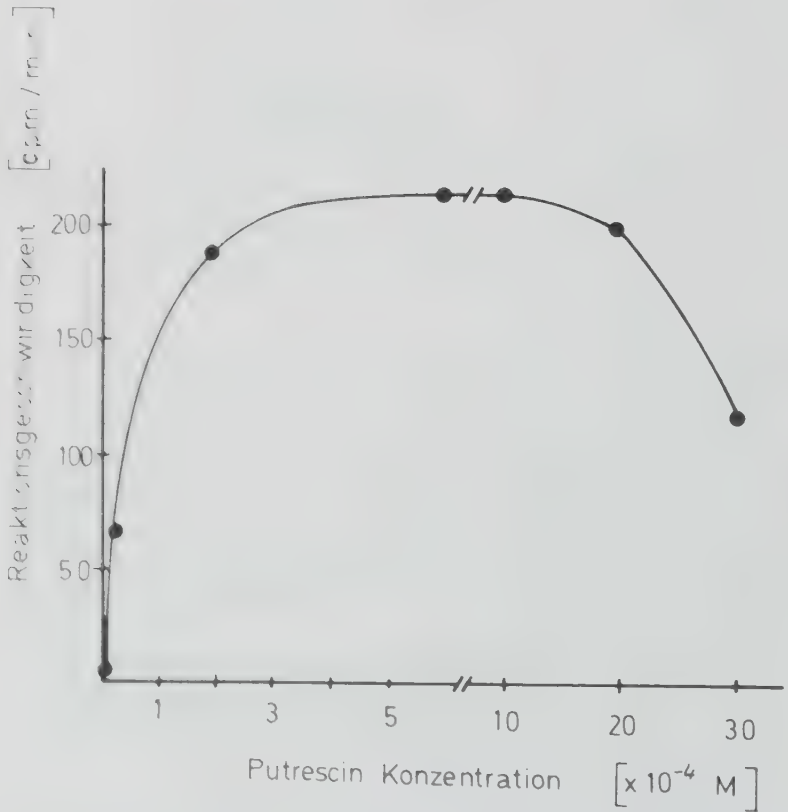


Abb. 6: Abhängigkeit der Diaminoxidase-Aktivität des
hündedünndarmes von der Substratkonzentration
im Isotopentest.

Mittelwerte von 2 Bestimmungen. Weitere Bedingungen siehe Material und Methodik.

III. 1.2. Extraktion

Die Standardisierung der Extraktion erwies sich als relativ schwierig. Entsprechend den Empfehlungen von OKUYAMA und KOBAYASHI (1961) benutzten wir als Extraktionslösung Toluol-PPO (0,35 %). 2,2-p-phenylenebis-(5-phenyloxazol) (POPOP) verbesserte die Zählausebeute nicht.

Die Menge von Δ_1 -Pyrrolin und seinen Polymeren, die von der wässrigen Phase in die organische Phase extrahiert wurde, hing ab

1. von der Menge der Extraktionslösung,
2. der Extraktionsdauer und
3. dem pH-Wert der wässrigen Phase.

Als optimale Extraktionsbedingungen ermittelten wir 5 ml Extraktionslösung, 4 Minuten Extraktionsdauer durch Schütteln auf einem Horizontalschüttler und einen pH-Wert von 9,6 - 10,2 für die wässrige Phase. Bei weniger als 4,5 ml Extraktionslösung und einer Extraktionsdauer über 10 min nahm die extrahierte Radioaktivität geringfügig ab.

Schon OKUYAMA und KOBAYASHI (1961), und nach ihnen TUFVESSON und TRYDING (1969) zeigten, daß die Extraktion von Putrescin und Δ_1 -Pyrrolin stark vom pH-Wert der wässrigen Phase abhängt. Bis pH 10,5 wurde (^{14}C -) Putrescin nur gering extrahiert (<1 %). Oberhalb dieses pH-Wertes stieg der Übertritt von Putrescin in die organische Phase stark an. Die extrahierte Menge Δ_1 -Pyrrolin stieg dagegen schon im leicht basischen Bereich steil an und erreichte von pH 9,0 - 10,5 annähernd ein Plateau mit nur geringem Anstieg. Oberhalb pH 10,5 nahm die extrahierte Radioaktivität, vermutlich hauptsächlich durch Zunahme der Extraktion von (^{14}C -) Putrescin, wieder zu (Abb. 7).

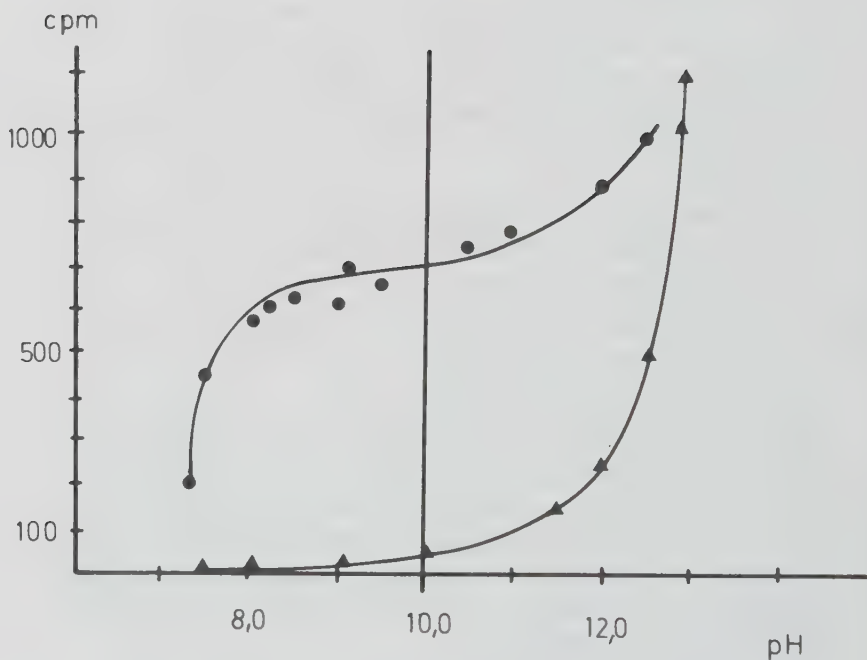


Abb. 7: Extraktion von ^{14}C -Putrescin und ^{14}C - Δ_1 -Pyrrolin aus der wässrigen Phase in die organische Phase (Toluol-PPO) in Abhängigkeit von dem pH-Wert der wässrigen Phase.

▲▲ ^{14}C -Putrescin, extrahiert aus dem Inkubationsansatz nach 0 min. Reaktionszeit. ●● ^{14}C - Δ_1 -Pyrrolin, extrahiert aus dem Inkubationsansatz nach Ablauf der Reaktion. Einstellung des pH-Wertes vor der Extraktion durch Zugabe entsprechender Mengen 2 N NaOH. Mittelwerte aus 4 Bestimmungen. Weitere Bedingungen siehe Material und Methodik.

Um eine Standardisierung der Methode zu ermöglichen, stellten wir die wässrige Phase vor der Extraktion durch Zugabe von "stark alkalischem Puffer" auf einen konstanten pH-Wert von $10,0 \pm 0,1$ ein.

III, 1.3. Zählausbeute

Wie unter II. 2.1.3.3. beschrieben, wurde zur Quenchkontrolle ^{14}C -Toluol dem Ansatz an zwei verschiedenen Stufen im Isotopentest zugegeben. Die Zählausbeute betrug dabei durchschnittlich $93 \pm 2\%$. Die Proben waren demnach praktisch ungequencht.

III, 1.4. Kriterien für die Auswertung des Isotopentests

III, 1.4.1. Reaktionskinetik

Bei Zunahme der Inkubationszeiten stiegen die cpm/Ansatz linear in Abhängigkeit von der Länge der Inkubationszeit:

$$\frac{\text{cpm / Ansatz}}{\text{min (Inkubationszeit)}} = \text{konstant}$$

Die Steigung der Geraden wurde von der Menge und der spezifischen Aktivität des benutzten Enzyms bestimmt (Abb. 8).

Bei niedrigen Reaktionsgeschwindigkeiten verlief die Reaktionskinetik wenigstens 90 min linear. Wurde aber die Zahl von 5000 cpm/Ansatz überschritten, nahm die Reaktionsgeschwindigkeit (cpm/min), wahrscheinlich auf Grund von Substratverbrauch, wieder ab. Bei hohen Enzymaktivitäten sollte deshalb das Enzym entweder verdünnt oder kurze Inkubationszeiten gewählt werden.

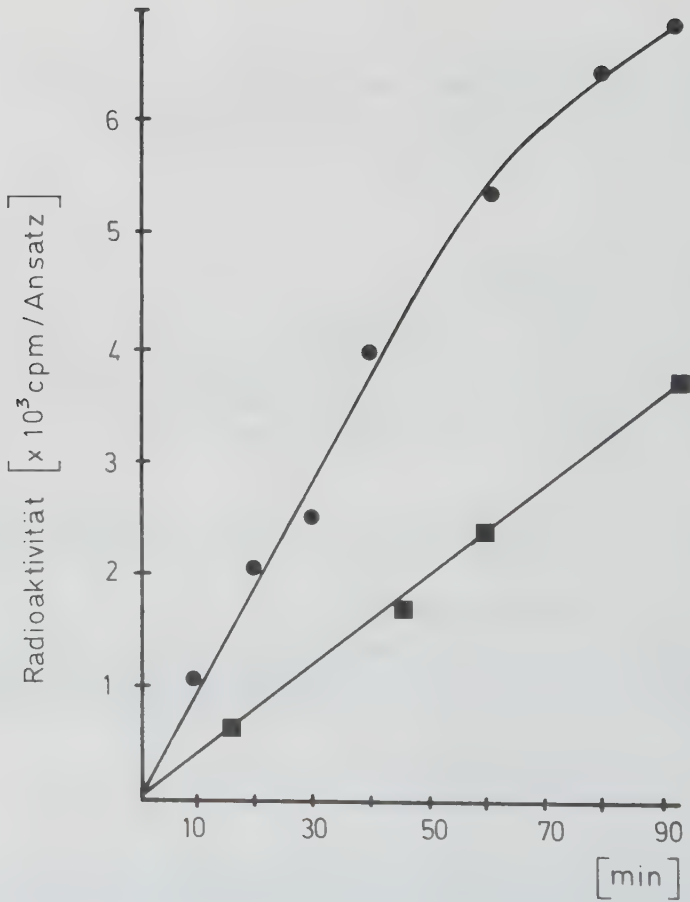


Abb. 8: Reaktionskinetik der oxidativen Desaminierung von ¹⁴C-Putrescin durch Hundedarm-Diaminoxidase und Bildung von ¹⁴C- Δ_1 -Pyrrolin

●● Enzymaktivität 0,45 mU/Ansatz,

■■ Enzymaktivität 0,18 mU/Ansatz.

Weitere Bedingungen siehe Material und Methodik.

III. 1.4.2. Empfindlichkeit des Isotopen- und NADH-Tests

Die Empfindlichkeit eines Isotopentests hängt neben anderen Faktoren, wie spezifische Aktivität der radioaktiven Verbindung, auch sehr stark von der Höhe der Leerwerte ab.

In einer Testreihe ($n = 10$) betrugen die Zählraten der Leerwerte durchschnittlich 13 ± 2 cpm/Ansatz, die der Testwerte bei 30 min Inkubation mit Kontrollenzym 1167 ± 14 cpm/Ansatz. Dieser Wert entsprach einer Enzymaktivität von 0,18 mU/Ansatz im NADH-Test. Die große Empfindlichkeit des Isotopentests ermöglichte sogar noch die Bestimmung einer Enzymaktivität von 0,003 mU/Ansatz. Als niedrigste, noch meßbare Diaminoxidaseaktivität fanden wir im NADH-Test bei gleichen Inkubationsbedingungen (gleicher pH-Wert, 30 min Inkubationszeit) 0,08 mU/Ansatz. Die Empfindlichkeit des Isotopentests war also 25 mal höher.

III. 1.4.3. Reproduzierbarkeit und Präzision

Wir bestimmten die Aktivität eines gereinigten Hundedarm-Diaminoxidasepräparates in 2 Serien á 10 Ansätze an 2 verschiedenen Tagen unter sonst gleichen Bedingungen. Die Diaminoxidaseaktivität betrug 39 ± 2 cpm/min, der Variationskoeffizient 4 %.

Innerhalb einer Serie streuten die Werte um ($S_E =$) 0,85 cpm/min (2,2 %), die Streuung zwischen beiden Serien ergab ($S_B =$) 1,73 cpm/min (4,4 %).

Nach GOOSZEN (1960) stellte der S_B -Wert dabei ein realistisches Maß für die Präzision des Tests dar. Der Isotopentest erwies sich somit unter den erarbeiteten Bedingungen als sehr präzise Bestimmungsmethode für die Diaminoxidaseaktivität.

Wir untersuchten auch die Reproduzierbarkeit des NADH-Tests. Da der Variationskoeffizient von der Enzymaktivität abhing, führten wir 2 Meßserien mit verschiedenen Enzymaktivitäten durch. Bei einer Diaminoxidaseaktivität von 0,15 mU/Ansatz betrug der Variationskoeffizient 6,6 %, bei 21 mU/Ansatz dagegen nur 0,3 %. In unserer Meßreihe war bei einer Diaminoxidaseaktivität von 0,18 mU/Ansatz der Isotopentest etwas präziser als der NADH-Test, ein Ergebnis, das z. B. auf Grund der häufigeren Pipettievorgänge bei letzterem Test durchaus zu erwarten war. Beide Tests lagen jedoch deutlich unterhalb der 10 % Grenze des Variationskoeffizienten, die nach klinisch-chemischen Richtlinien einen brauchbaren Test kennzeichnet.

III. 1.5. Eichung des Isotopentests mit dem NADH-Test

Die Berechnung der Enzymaktivität in Internationale Einheiten ($1 \text{ U} = 1 \mu\text{Mol Substratumsatz/min}$, $1/1000 \text{ U} = 1 \text{ mU}$) setzte voraus, daß entweder der Substratabbau oder die Produktbildung quantitativ zu bestimmen war. Die direkte Korrelation zwischen cpm/min und der Desaminierungsrate wäre unter der Voraussetzung möglich, daß bekannt wäre, wieviel des tatsächlich gebildeten Δ_1 -Pyrrolins unter den beschriebenen Bedingungen in die Organische Phase extrahiert wird. Zur Bestimmung eines inneren Standards (= Extraktionsausbeute) könnte eine bestimmte Menge ^{14}C - Δ_1 -Pyrrolin vor der Extraktion dem Inkubationsansatz zugegeben und die Ausbeute an extrahiertem Δ_1 -Pyrrolin gemessen werden. Dieses Verfahren scheiterte jedoch daran, daß Δ_1 -Pyrrolin im Handel nicht erhältlich war und deshalb nicht zur Verfügung stand. Um dennoch die Diaminoxidaseaktivität von cpm/min in mU umrechnen zu können, wurde der Isotopentest mit dem NADH-Test geeicht.

In mehreren Meßreihen wurde die Aktivität einer gereinigten Hundedarm-Diaminoxidase mit beiden Methoden bestimmt (Abb. 9). 1 mU im NADH-Test entsprach dabei 215 cpm/min, der Korrelationskoeffizient betrug 0,99. Zu beachten war jedoch, daß diese Eichung nach der Herstellung einer neuen Substratlösung von ^{14}C -Putrescin stets wiederholt werden mußte, da Schwankungen der spezifischen Aktivität (z.B. als Folge einer neuen Charge von ^{14}C -Putrescin oder des Wechsels von Firmenpräparaten) eine Änderung der Korrelation zwischen mU und cpm/min bedingen konnten.

Wir führten deshalb, um solche und auch andere Schwankungen zu erkennen, innerhalb der statistischen Qualitätskontrolle regelmäßig Eichkontrollen mit einem stabilen Enzympräparat durch.

^{14}C - Putrescine - Test
[cpm / min]

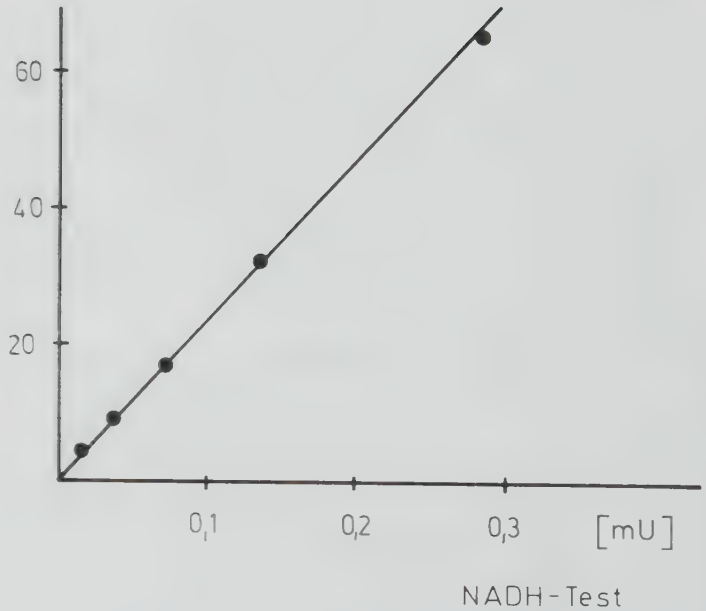


Abb. 3: Bestimmung der Diaminoxidase-Aktivität mit dem NADH-Test und der Isotopenmethode
Enzympräparat aus Hundedünndarm, spezifische Aktivität 6,6 mU/mg Protein. Substrat: ^{14}C -Putrescin und nicht radioaktiv markiertes Putrescin ($1 \times 10^{-3}\text{M}$). Weitere Bedingungen siehe Material und Methodik.

III. 2. Diaminoxidaseaktivität in Organen, Vollblut und Plasma des Kaninchens

Im Gegensatz zu allen anderen bisher untersuchten Säugetieren enthielten die Organe des Kaninchens bis auf den Gastrointestinaltrakt praktisch keine Diaminoxidaseaktivität. Im Duodenum beginnend nahm hier die Aktivität bis zum unteren Jejunum zu und im Ileum wieder ab. Die Aktivität des Colons war nur gering, der Magen enthielt keine Aktivität. Die Mesenteriallymphknoten enthielten eine Diaminoxidaseaktivität, die aber weit geringer war als in der Darmwand. Die Diaminoxidaseaktivität im Plasma und im Vollblut war sehr niedrig und zum Teil nicht meßbar (Abb. 10).

III. 3. Diaminoxidaseaktivität und Histamingehalt in den verschiedenen Abschnitten des Darmes beim Menschen und Kaninchen

Die im menschlichen Dünndarm gemessenen Aktivitäten der Diaminoxidase waren im Verhältnis zu den anderen Organen dieser Spezies relativ hoch. Nierengewebe enthielt nur geringfügig höhere Aktivitäten. Verglichen mit der Schweineniere, dem Organ mit der höchsten, bisher bekannten Diaminoxidaseaktivität, sind diese Werte, wie die des Kaninchendarms, von mittlerer Größenordnung. Der Dünndarm des Hundes enthält 10-fach höhere Aktivitäten (KUSCHE et al. 1975) als der des Kaninchens (Abb. 11), was mit den Befunden von KIM et al. (1969) übereinstimmt.

Der Histamingehalt des Darmes ist bei den meisten Spezies relativ hoch. Beim Menschen erreicht er nach LORENZ und WERLE (in Druck) den höchsten Wert, der im menschlichen Organismus überhaupt beobachtet wird. Der Darm des Kaninchens gehört mit 3 $\mu\text{g/g}$ Gewebe zu den histaminärmsten der bisher untersuchten Säugetiere (LORENZ und WERLE, in Druck) (Abb. 11).

Gewebe	Diaminoxidase-Aktivität (mU/g Frischgewicht bzw. ml Plasma)
Gl. submandibularis	0
Gl. parotis	0
Magen	0
Duodenum	1,7 $\pm$ 1,1
Jejunum	6,6 $\pm$ 4,1
Ileum	4,0 $\pm$ 3,0
Colon	2,8 $\pm$ 2,6
Leber	0
Pankreas	0
Milz	0
Niere	0
Lunge	0
Herz	0
Thymus	0
Plasma	0,02 $\pm$ 0,02

Abb. 10: Diaminoxidase-Aktivität in verschiedenen Geweben
des Kaninchens

Mittelwerte $\pm$ S.D. von 5 Versuchstieren.

Bestimmung der Enzymaktivität mit dem Isotopen-
test. Sonstige Bedingungen siehe Material und
Methodik,

Diaminoxidase-Aktivität (mU/g Frischgewicht)

Gewebe	n	Mensch	Kaninchen (n = 6)
oberes Jejunum	3	4,5 ± 1,7	5,8 ± 3,0
unteres Jejunum	-	-	7,3 ± 5,3
oberes Ileum	6	0,9 ± 1,5	4,7 ± 3,9
unteres Ileum	9	1,2 ± 0,9	3,4 ± 1,9
Histamingehalt (µg/g Frischgewicht)			
oberes Jejunum	3	24,4 ± 14,0	3,0 ± 2,0
unteres Jejunum	-	-	-
oberes Ileum	6	16,1 ± 10,9	-
unteres Ileum	9	19,2 ± 7,7	-

Abb. 11: Diaminoxidase-Aktivität und Histamingehalt in verschiedenen Dünndarmabschnitten von Mensch und Kaninchen.
 Mittelwerte ± S.D. Substrate des Enzyms: Putrescin (¹⁴C-Putrescin und kaltes Putrescin 10-3M). Histamingehalt und Diaminoxidase-Aktivität wurden am gleichen Individuum getestet. Beim Menschen wurde die Entnahmestelle intraoperativ geprüft, bei den Versuchstieren nach Entnahme des ganzen Darmes, oberes Jejunum entsprach der 2. Jejunalschlinge, unteres Jejunum dem Ende des 1. Darmdrittels, oberes Ileum 30 cm distal davon, unteres Ileum dem terminalen Abschnitt des Dünndarmes von etwa 20 cm. Es wurde die ganze Darmwand verwendet. Sonstige Bedingungen siehe Methodik.

Das Vollblut des Kaninchens enthält dagegen die 3 - 4-fache Histaminkonzentration, ein Befund, der bei der Untersuchung der pathophysiologischen Rolle der Diaminoxidase berücksichtigt werden muß. Auch der Histamingehalt des Magens und der Lunge ist, verglichen mit dem Dünndarm, um ein Vielfaches höher.

III. 4. Reinigung und Charakterisierung der Diaminoxidase des Kaninchendünndarms

III. 4.1. Die Untersuchung von Muscularis und Mucosa des Darmes mit dem Isotopentest zeigte, daß die Diaminoxidase ausschließlich in der Schleimhaut lokalisiert ist.

Ein Rohhomogenat der Darmschleimhaut wurde mit unterschiedlicher Beschleunigung zentrifugiert. Das Enzym verblieb auch bei der höchsten Beschleunigung praktisch vollständig im Überstand (Abb. 12). Der mit Phosphatpuffer aufgenommene Bodensatz enthielt keine nennenswerte Aktivität. Aus diesen Ergebnissen konnte gefolgert werden, daß die Diaminoxidase aus der Schleimhaut des Kaninchendarms ein lösliches und damit wahrscheinlich cytoplasmatisches Enzym ist.

III. 4.2. Durch Gelfiltration an Sephadex G 50 und Sephadex G 200 gelang uns eine Anreicherung der Enzymaktivität aus dem Rohextrakt um das 100-fache (Abb. 15). Die zur Anreicherung der Hundedarmdiaminoxidase angewandte Methode, mit der wir dabei eine ca. 700-fache Anreicherung erzielten, versagte bei dem Enzym aus Kaninchendarm. Schon nach den Anfangsschritten dieses für die Anreicherung von Diaminoxidasen klassischen Verfahrens wie Hitzeschritt, Ammoniumsulfatfraktionierung, Chromatographie an DEAE- oder Sephadex-DEAE-

Beschleunigung in der Ultrazentrifuge (x 1000 g)	Diaminoxydase-Aktivität (mU/ml Enzym)
2	5,8 $\pm$ 4,1
48	6,5 $\pm$ 4,2
100	6,4 $\pm$ 3,9

Abb. 12: Aktivität der Diaminoxydase aus Kaninchen-
dünndarm im Überstand von Rohhomogenaten
nach unterschiedlich hoher Beschleunigung
in der Ultrazentrifuge
Mittelwerte $\pm$ S.D. von 4 Versuchen an 4
verschiedenen Kaninchen. Terminales Ileum.
Putrescin 10^{-3} M als Substrat. Bestimmung
der Aktivität des Enzyms mit dem Isotopen-
test. Sonstige Bedingungen siehe Material
und Methodik.

Zellulose (MONDOVI et al. 1964, LORENZ et al. 1971) ging praktisch die gesamte Enzymaktivität verloren. Insgesamt erwies sich die Diaminoxidase des Kaninchendarms als sehr labil. Erst nach Gelfiltration über Sephadex G 50 behielt das Enzympräparat bei minus 20°C über 14 Tage gegenüber Putrescin als Substrat die volle Aktivität. Das Sephadex G 50-Präparat setzte im NADH-Test sowohl Putrescin als auch Serotonin als Substrat um. Die Aktivität gegen Serotonin ging aber schon nach 3 - 4 Tagen verloren (Abb. 13).

Durch weitere Gelfiltration über Sephadex G 200 wurden zwei Enzyme aufgetrennt (Abb. 14). Das eine Enzym desaminierte Putrescin und zeigte alle Eigenschaften einer Diaminoxidase, während das andere Enzym nur Serotonin als Substrat umsetzte, nicht dagegen Putrescin. Dieses Enzym entsprach in seinen Eigenschaften einer löslichen Monoaminoxidase.

Die spezifische Aktivität des Diaminoxidasepräparates betrug nach der Gelfiltration über Sephadex G 200 0,7 mU/mg Protein. Das Enzym war um das 100-fache angereichert und die Ausbeute der in einem Gesamtvolumen von 15 - 20 ml enthaltenen Aktivität betrug 273 % (Abb. 15), ein Ergebnis, das 4 mal reproduziert wurde und das wir auf Inhibitoren der Diaminoxidase im Darm zurückführten.

Die Serotonin abbauende Aktivität konnte erst nach der Gelfiltration über Sephadex G 50 mit dem NADH-Test gemessen werden. Die spezifische Aktivität des G 50-Präparates betrug für den Serotoninabbau 0,46 mU/mg Protein. Sie war damit um das 13,5-fache höher als die spezifische Aktivität der Putrescin abbauenden Diaminoxidase. Nach der Gelfiltration über Sephadex G 200 stieg die spezifische Aktivität auf 18,4 mU/mg Protein, was einer 40-fachen Reinigung entsprach.

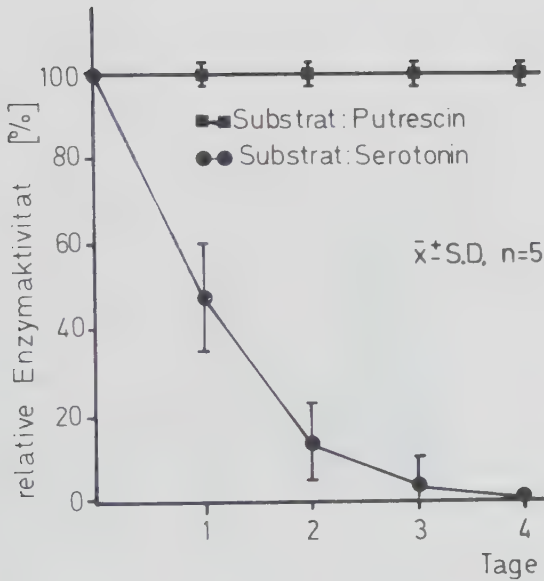


Abb. 13: Stabilität des Enzympräparates aus Kaninchen-
dünndarm nach Gelfiltration über Sephadex
G 50 bei einer Lagertemperatur von -20°C
 $\bar{x} \pm \text{S.D.}, n = 5$, ■ Substrat Putrescine
($0,25 \pm 0,1 \text{ mU/ml} = 100\%$), ● Substrat
Serotonin ($0,24 \pm 0,1 \text{ mU/ml} = 100\%$).
Die Enzymaktivität wurde mit der NADH-Methode
bestimmt. Weitere Bedingungen siehe Material
und Methodik.

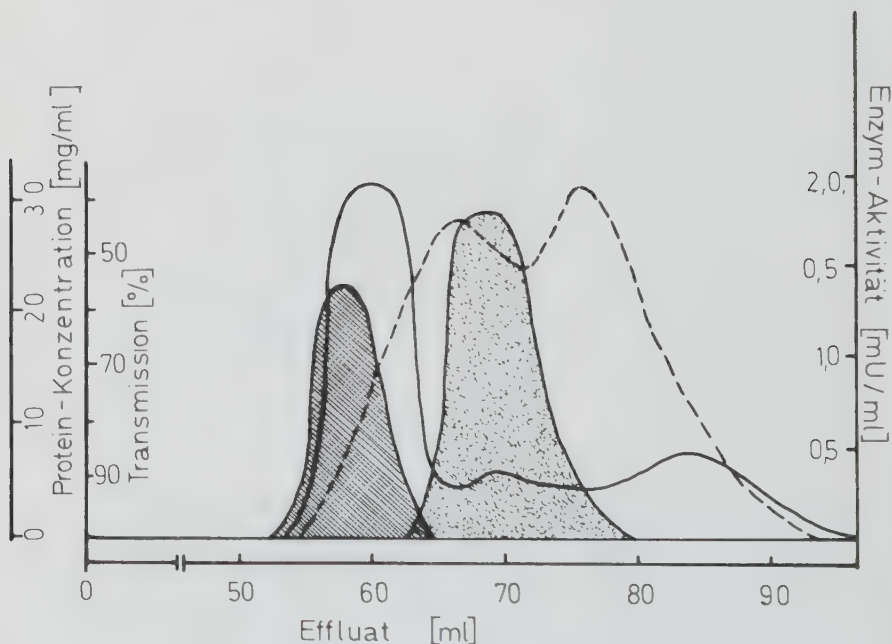


Abb. 14: Gelfiltration eines Sephadex G 50-Präparates der Aminoxidase aus Kaninchendünndarm an Sephadex G 200

Diagramm der Ergebnisse aus einem Einzelversuch. Die Enzymaktivität wurde mit der NADH-Methode gemessen, die Proteinkonzentration nach LOWRY et al. bestimmt. — % Transmission, gemessen bei 280 nm mit dem Uvicord II Spektrometer (LKB), --- Proteinkonzentration,  Serotonin abbauende Aktivität,  Putrescin abbauende Aktivität. Weitere Bedingungen siehe Material u. Methodik.

Aufarbeitung	Volumen (ml)	Gesamt- aktivität (mU)	Gesamt- Protein (mg)	Spez. Aktivität (mU/mg)	Anrei- cherung	Ausbeute (%)
Homogenat	66	14,5	1954	0,007	1,0	100
Zustand nach Zentrifugation (30 min.; 48000 g)	45	18,5	837	0,022	3,1	129
Gelfiltration an Sephadex G 50	58	12,3	352	0,034	4,9	85
Gelfiltration an Sephadex G 200	210	39,7	57	0,70	100	273

Abb. 15: Anreicherung der Diaminoxidase aus Kaninchendünndarm

Ergebnisse aus einem Einzelversuch, von dem insgesamt 4 durchgeführt wurden und reproduziert werden konnten. Die Anreicherung des Enzyms wurde angegeben als Vielfaches der spezifischen Aktivität des Ausgangshomogenates. Beachtenswert erscheint die Zunahme der Gesamtktivität nach Gelfiltration an Sephadex G 200, die in allen 4 Experimenten beobachtet und durch Inhibitoren der Diaminoxidase erklärt wurde.

III. 4.3. Mit dem NADH- und dem Isotopentest untersuchten wir die biochemischen Eigenschaften der gereinigten Kaninchendarm-Aminoxidasen:

III. 4.3.1. Stabilität

Die Aktivität des gereinigten, Putrescin abbauenden Enzyms blieb bei einer Lagertemperatur von minus 20°C über mehrere Monate konstant. Das Serotonin abbauende Enzym war dagegen auch nach der Gelfiltration über Sephadex G 200 sehr labil und verlor seine Aktivität bei einer Lagertemperatur von minus 20°C innerhalb weniger Tage.

III. 4.3.2. pH-Optimum (Abb. 16)

Das pH-Optimum der Diaminoxidase lag für den Putrescinabbau bei pH 6,8. Zum alkalischen Bereich fiel die Kurve steil ab, während sie zum sauren Bereich hin relativ flach verlief. Das pH-Optimum der Diaminoxidase für den Histaminabbau lag bei pH 7,6.

Die pH-Kurve des Serotoninabbaus durch die Monoaminoxidase zeigte einen dreigipfligen Verlauf. Bei pH 6,4 und 7,6 fand sich ein relatives, bei pH 8,7 ein absolutes Optimum. Histamin wurde von diesem Enzym nicht angegriffen.

III. 4.3.3. Substratoptimum und Michaeliskonstante

Die optimale Substratkonzentration für den Putrescinabbau betrug bei pH 6,8 $0,8 \times 10^{-3}$ M. Höhere Konzentrationen hemmten das Enzym, sodaß $V_{\max}$ wie bei vielen anderen Enzymen nicht erreicht wurde.

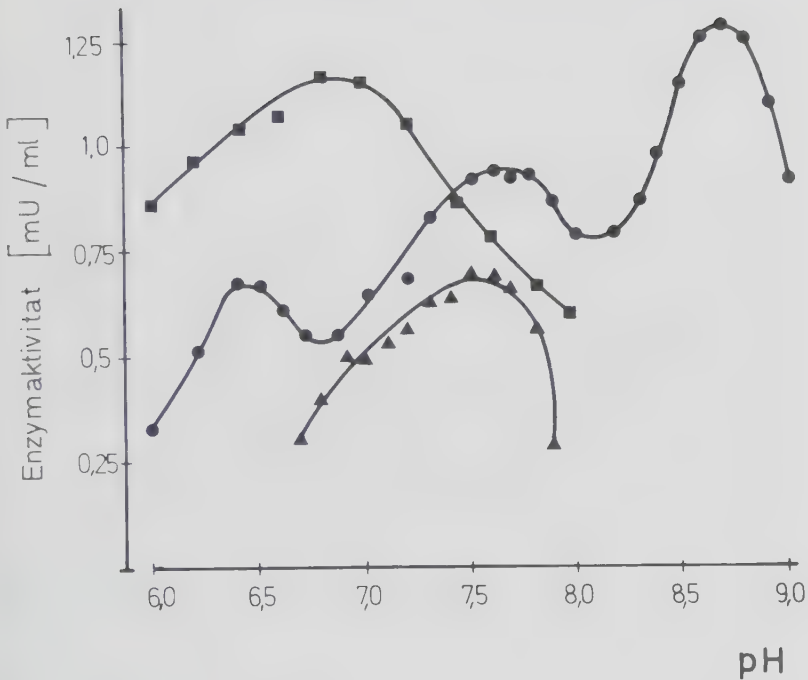


Abb. 16: pH-Abhängigkeit der Aminoxidasen-Aktivität
aus Kaninchendünndarm nach Gelfiltration
an Sephadex G 50 und G 200

Substrate: ■—■ Putrescine (1,0 mM), ●—● Sero-
tonin (1,0 mM), ▲—▲ Histamin (0,1 mM).

Mittelwerte von Doppelbestimmungen mit drei
verschiedenen Enzympräparaten. Die Enzym-
aktivität wurde mit dem NADH-Test bestimmt.
Weitere Bedingungen siehe Material und Methodik.

Die Michaeliskonstante betrug für Putrescin $1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$, für Histamin $0,9 \times 10^{-4} \text{ M}$. Für Serotonin wurde in Gegenwart des zweiten Enzyms eine $K_m = 1,8 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Abb. 17 u. 18) ermittelt.

III. 4.3.4. Hemmstoffe

Als Hemmstoffe wählten wir Aminoguanidin und Pargylin. Während Aminoguanidin die Diaminoxidasen pflanzlichen und tierischen Ursprungs hemmt, gilt Pargylin als typischer Monoaminoxidasehemmstoff. Die hemmende Wirkung von Aminoguanidin auf das Putrescin und Histamin abbauende Enzym war sehr stark, Pargylin hemmte dagegen dieses Enzym nur gering, hatte aber eine stark hemmende Wirkung auf das Serotonin abbauende Enzym (Abb. 19). Diese Ergebnisse sprechen eindeutig für den Diaminoxidasecharakter des einen und den Monoaminoxidasecharakter des anderen Enzyms.

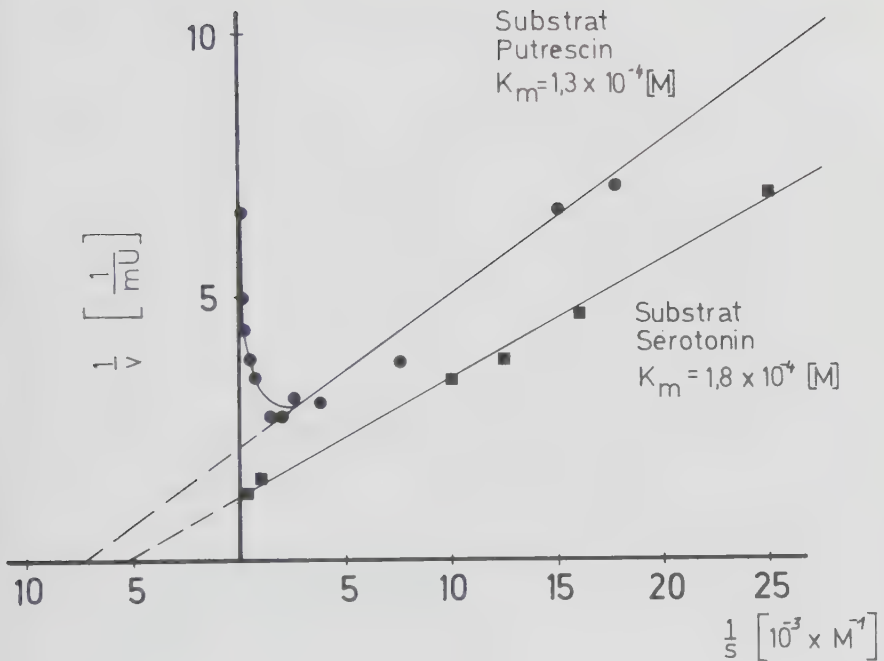


Abb. 17: Bestimmung der Michaeliskonstanten der Aminoxi-
dasen des Kaninchendünndarmes nach Gelfiltration
über Sephadex G 50 und G 200 mit Putrescine und
Serotonin als Substrat (nach LINEWEAVER-BURK, 1934).
Bestimmung der Enzymaktivitäten mit dem NADH-Test.
Mittelwerte von 2 Bestimmungen.
Substrate: ● Putrescine, ■ Serotoninhydrogenmal-
einate. Weitere Bedingungen siehe Material und
Methodik,

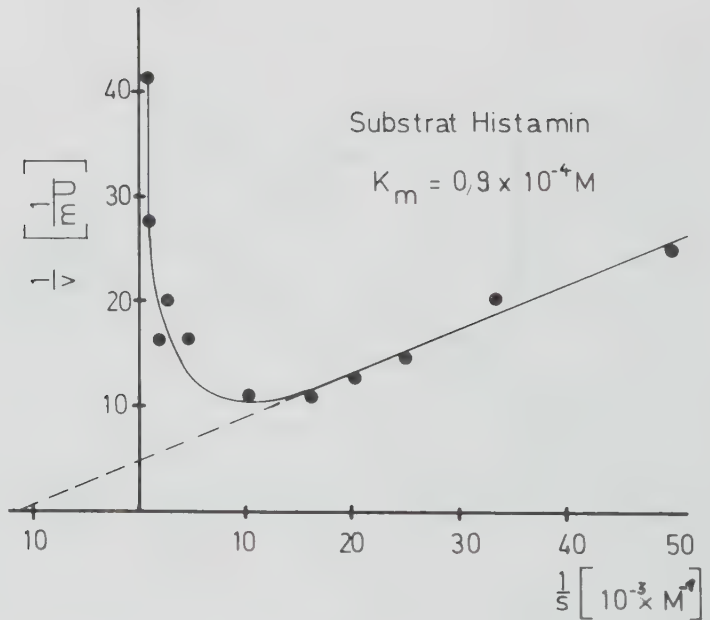


Abb. 18: Bestimmung der Michaeliskonstante der Diaminoxidase des Kaninchendünndarmes nach Gelfiltration über Sephadex G 50 und G 200 mit Histamin als Substrat (LINEWEAVER-BURK).

Bestimmung der Enzymaktivität mit dem NADH-Test.
Mittelwerte von 2 Bestimmungen. Weitere Bedingungen siehe Material und Methodik.

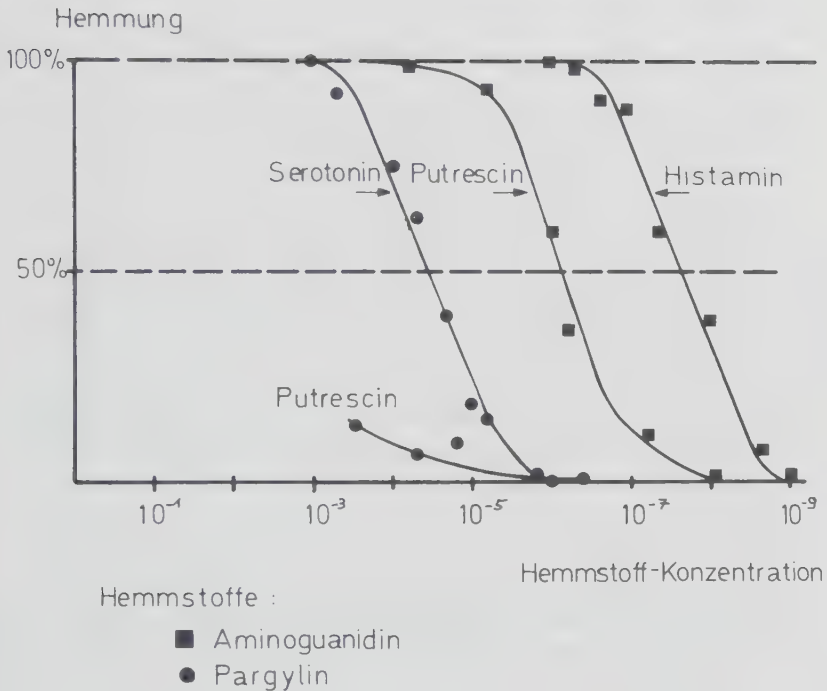


Abb. 19: Hemmung der Aminoxidasen des Kaninchendünndarms mit Aminoguanidin und Pargylin

Es wurden die gereinigten Enzympräparate nach Gelfiltration über Sephadex G 50 und G 200 benutzt. Die Enzymaktivität wurde mit dem NADH-Test gemessen. Substrate: Putrescine ($ID_{50} = 8 \times 10^{-7}$ M mit Aminoguanidin), Serotonin-hydrogenmaleinat ($ID_{50} = 3,4 \times 10^{-5}$ M mit Pargylin), Histamin ($ID_{50} = 2,1 \times 10^{-8}$ M mit Aminoguanidin). Weitere Bedingungen siehe Material und Methodik.

III. 5. Intestinale Ischämie

III. 5.1. Nachweis der intestinalen Ischämie

III. 5.1.1. Die Sauerstoffspannung im Bereich des Jejunums betrug an der Serosa vor Verschuß der Arteria mesenterica superior $40,4 \pm 11,0$ Torr. 15 min nach dem Verschuß sank der pO_2 auf $3,0 \pm 2,2$ Torr. ($p < 0,001$) und betrug nach 70 minütiger Ischämie $2,2 \pm 2,0$ Torr. Die Sauerstoffspannung der Mucosa war deutlich niedriger. Der Ausgangswert von $6,1 \pm 5,9$ Torr vor der Ischämie sank 15 min nach Verschuß der Arteria mesenterica superior auf nicht mehr meßbare Werte. Nach 90 min. Ischämie konnte weiterhin keine Sauerstoffspannung nachgewiesen werden. Die Schleimhaut erschien ödematös und geschwollen. 10 min nach der Revaskularisation des Darmes stieg der pO_2 der Mucosa auf $10,0 \pm 9,1$ Torr an (Abb. 20).

Die ausgeprägte Hypoxie der Serosa und die Anoxie der Mucosa während des Verschlusses der Arteria mesenterica superior sprechen eindeutig für eine komplette intestinale Ischämie. Die erhöhten Sauerstoffwerte nach der Revaskularisation betrachten wir als Zeichen einer Hyperämie.

III. 5.1.2. Die histologische Untersuchung der unmittelbar nach dem Kreislaufstillstand entnommenen Darmproben zeigte eine ausgeprägte Spitzennekrose der Zotten, eine Eosinophilie der Zottenbasis und ein Ödem der Darmwand. Diese deutlichen Zeichen einer Darmischämie fanden wir bei allen Versuchstieren, nicht aber bei den scheinoperierten Tieren.

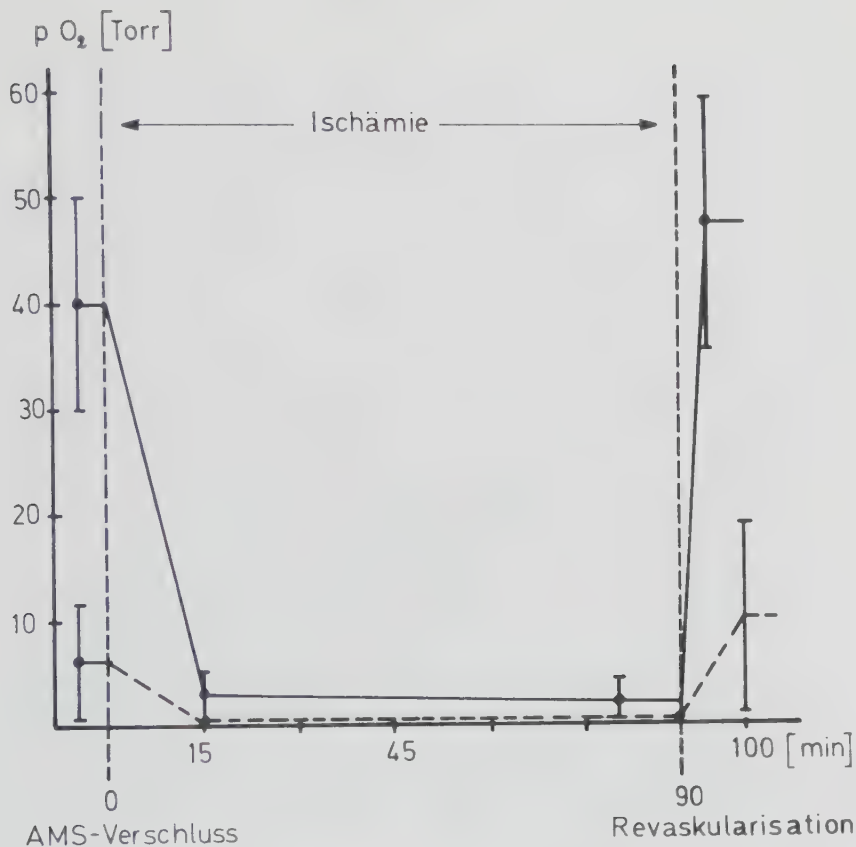


Abb. 20: Sauerstoffspannung (pO_2) in der Wand des Kaninchendünndarms bei Verschuß der Arteria mesenterica superior und anschließender Revaskularisation

Polarographische Sauerstoffdruckmessung mit einer Platin-Oberflächenelektrode nach KESSLER (1967). Mittelwerte ($\bar{x} \pm S.E.$) von 5 Kaninchen.

— Serosaseite, ---- Mucosaseite des Darmes.

Weitere Bedingungen siehe Material und Methodik.

III. 5.1.3. Makroskopisch verfärbte sich der unmittelbar nach Ischämie blasse Darm zunehmend livide. Die beim Menschen nach längerer Ischämie beobachtete hämorrhagische Infarzierung trat bei unseren Versuchstieren nicht auf. Wahrscheinlich war die Ischämiedauer von 90 min dafür zu kurz. Der Darm wurde nach der Revaskularisation wieder rosa bis rot. In der Darmwand bildeten sich petechiale Blutungen.

Unser Versuchsmodell ist anhand der obigen Ergebnisse als eine akute, komplette intestinale Ischämie aufzufassen, die wegen ihrer relativen Kürze nur reversible Veränderungen am Darm hervorruft. Besonders die Rosafärbung und der starke Wiederanstieg des Sauerstoffdruckes nach der Revaskularisation weisen auf eine günstige Prognose für das Überleben des Darmes hin. Die Tatsache, daß trotzdem alle Versuchstiere nach intestinaler Ischämie starben, ist deshalb wahrscheinlich Folge eines akuten Kreislaufkollapses, der durch vasoaktive Substanzen hervorgerufen wurde, die während der Ischämie im Darm gebildet oder freigesetzt und nach der Revaskularisation massiv in den Kreislauf ausgeschwemmt wurden.

III. 5.2. Die Diaminoxidaseaktivität im Kaninchendarm bei intestinaler Ischämie

Nach 90 min. Ischämie betrug die Diaminoxidaseaktivität noch 80 % des Ausgangswertes vor Verschuß der Arteria mesenterica superior. 10 min nach der Revaskularisation sank die Diaminoxidaseaktivität um weitere 15 % auf 65 % des Ausgangswertes (Abb. 21).

Überraschender Weise blieb der Plasmadiaminoxidasespiegel sowohl während der Ischämie als auch nach der

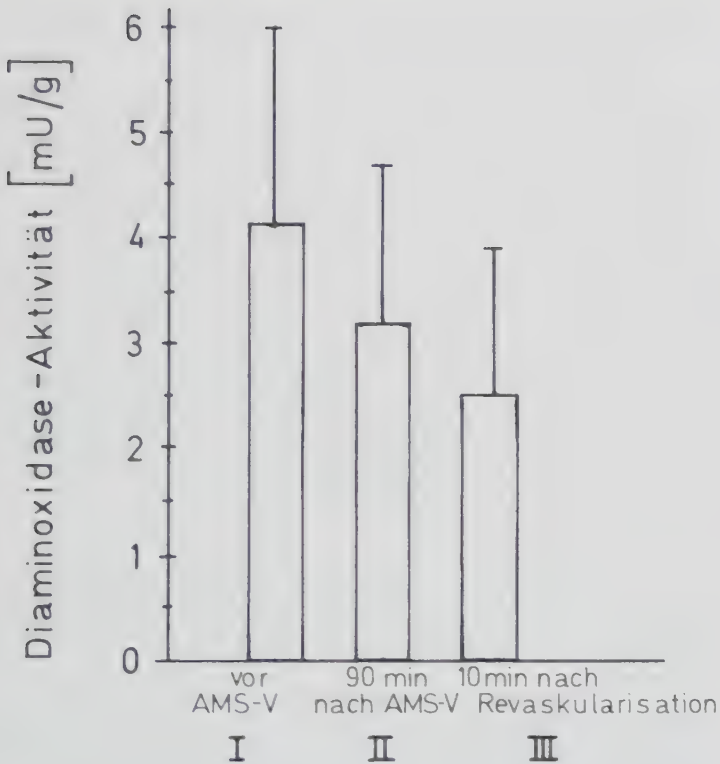


Abb. 21: Einfluß der intestinalen Ischämie und Revaskularisation der Mesenterialgefäße auf die Diaminoxidase-Aktivität des Kaninchendünndarms. Mittelwerte $\bar{x} \pm$ S.D. von 5 Versuchstieren. Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität mit dem Isotopentest. Entnahmestelle für Gewebe war das proximale Jejunum. $p(I/II) < 0,05$, $p(I/III) < 0,01$. Sonstige Bedingungen siehe Material und Methodik.

Revaskularisation gegenüber dem Ausgangswert von 0,02 $\pm$ 0,02 mU/ml unverändert.

Bei einer Ausschwemmung von 15 % der gesamten intestinalen Diaminoxidase, wie sie entsprechend dem Verlust an Enzymaktivität nach der Revaskularisation zu erwarten gewesen wäre, müßte aber rein rechnerisch bei Zugrundelegung von 100 ml Plasmavolumen und 50 g Dünndarmgewebe pro Kaninchen die Diaminoxidaseaktivität im Plasma auf 0,3 mU/ml Plasma zunehmen. Der Verbleib dieser Enzymaktivität muß zwar zunächst als ungeklärt betrachtet werden, eine Klärung wäre jedoch von großem Interesse, da der Nachweis einer Diaminoxidasefreisetzung aus dem ischämischen Darm zur Diagnose eines Mesenterialinfarktes beitragen könnte.

III. 5.3. Wirkung der Perfusion des ischämischen Darmes auf die Überlebenszeit der Kaninchen nach intestinaler Ischämie

Eine Perfusion der Mesenterialgefäße im Anschluß an die 90 min. Ischämiezeit mit 500 ml 37° C-warmer Ringerlösung verlängerte die Überlebenszeit der Versuchstiere in der Revaskularisationsphase signifikant um das 8-fache ($p < 0,005$) (Abb. 22). Die Berechnung des harmonischen Mittels (CAVALLI-SFORZA 1972) erbrachte sogar eine Steigerung der Überlebenszeit um das 23-fache von 5 Minuten auf 94 Minuten.

Die Wirkung der Perfusion muß wahrscheinlich dadurch erklärt werden, daß während der Ischämie im Darm gebildete oder freigesetzte toxische Substanzen aus dem mesenterialen Gefäßbett herausgespült und damit wenigstens zum Teil aus dem Organismus eliminiert wurden. Bei den nicht perfundierten Kontrolltieren wurden diese Substanzen

Versuchs- Nr.	Überlebenszeit		
	(min) Perfusion	(min) keine Perfusion	(Stunden) Scheinoperation
1	95	4	13
2	90	15	11
3	74	28	22
4	135	16	18
5	180	40	15
6	281	1	-
7	81	3	-
8	118	10	-
$\bar{x} \pm \text{S.D.}$	132 ± 69	14 ± 13	14 ± 4

Abb. 22: Einfluß der Perfusion der Blutgefäße des ischämischen Darmes auf die Überlebenszeit während der Revaskularisationsphase nach Arteria mesenterica superior-Verschluß

Einzel- und arithmetische Mittelwerte $\bar{x} \pm \text{S.D.}$;
Signifikanz zwischen Tieren mit und ohne Perfusion ($p < 0,005$). Zur Anlage der Versuche siehe Material und Methodik.

nach der Revaskularisation in den Kreislauf ausgeschwemmt und lösten dort das unmittelbar folgende Kreislaufversagen aus.

III. 5.4. Der Einfluß von Ischämie und Perfusion der Mesenterialgefäße auf den Histamingehalt und die Diaminoxidaseaktivität des Kaninchendarms

Auch bei diesen Versuchen trat, wie in der vorhergehenden Versuchsreihe (III. 5.2.), ein signifikanter Abfall der Diaminoxidaseaktivität schon während der 90 min. Ischämie auf. Die anschließende Perfusion der Mesenterialgefäße führte zu einer weiteren Abnahme der Diaminoxidaseaktivität, ähnlich wie er bei der vorhergehenden Versuchsreihe (III. 5.2.) nach der Revaskularisation auftrat. Die anschließende Revaskularisation blieb dagegen bei diesen Versuchen praktisch ohne Einfluß auf die Enzymaktivität (Abb. 23).

Die Frage nach dem Verbleib der Diaminoxidaseaktivität stellte sich auch nach den Perfusionsversuchen. Es war naheliegend, das an der Pfortader aufgefangene Perfusat auf Enzymaktivität zu untersuchen. Im Perfusat konnte aber keine Diaminoxidaseaktivität nachgewiesen werden. Zur Beantwortung dieser Frage käme neben einer durch die Ischämie bedingten Inaktivierung des Enzyms durch Hemmstoffe oder Proteasen auch eine Ausschwemmung der Diaminoxidase in das lymphatische System (Ductus thoracicus) in Betracht. Diese Möglichkeit beantwortet die Frage jedoch nicht, sondern verschiebt sie nur, da dann das Enzym im Angulus venosus und somit auch im venösen Blut auftauchen müßte.

Die Histaminkonzentration der Darmwand zeigte im Gegensatz zu der Diaminoxidaseaktivität, die während der Versuchsdauer ständig abnahm, ein unterschiedliches

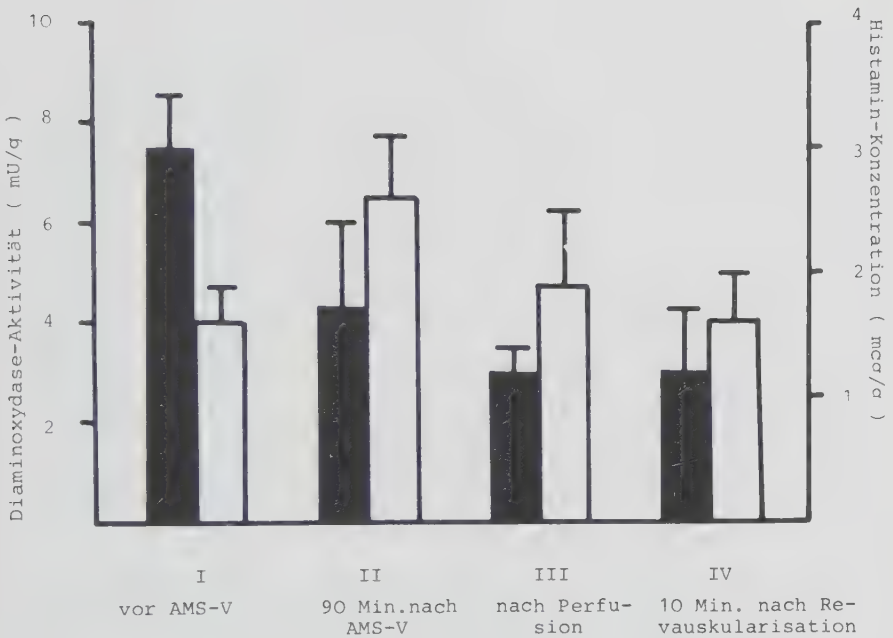


Abb. 23: Einfluß von intestinaler Ischämie, Perfusion und Revaskularisation auf die Diaminoxidaseaktivität und Histaminkonzentration des Kaninchendünndarms

Mittelwerte $\bar{x} \pm$ S.E. von 5 Versuchstieren. Gewebsentnahmen aus dem oberen Jejunum.

■ Diaminoxidaseaktivität, $p(I/II) < 0,005$,
 □ Histaminkonzentration, $p(I/II) < 0,02$. t-Test für gepaarte Daten.

AMS-V = Arteria mesenterica superior-Verschluß.
 Weitere Bedingungen siehe Material u. Methodik.

Verhalten in der Ischämiezeit und der anschließenden Perfusions- und Revaskularisationsphase. Am Ende der Ischämiezeit zeigte die Histaminkonzentration in der Wand des Dünndarms einen Anstieg von ca. 60 % des Ausgangswertes ($p < 0,02$). Während der Perfusion der Darmgefäße sank die Histaminkonzentration wieder ab und blieb auch nach der Revaskularisation auf einer Höhe, die in etwa dem Ausgangswert vor der Ischämie entsprach (Abb. 23).

Im Perfusat, das nach Durchströmung der Mesenterialgefäße an der Pfortader in 100 ml-Portionen aufgefangen wurde, fand sich ein relativ hoher Histamingehalt, besonders in der ersten Fraktion. In den weiteren Fraktionen nahm der Histamingehalt zwar ab, blieb aber in den letzten drei Fraktionen bemerkenswert konstant (Abb. 24), was gegen eine einfache Histamin-ausschwemmung spricht.

Diese Ergebnisse bedeuten eine Zunahme der Histaminmengen im Intestinum während des Arteria mesenterica superior-Verschlusses und eine Ausschwemmung von Histamin durch die Perfusion bzw. auch durch die Revaskularisation. In diesem Zusammenhang sind die Befunde von SCHAUER (1964) erwähnenswert, der am ischämischen Rattenmesenterium feststellte, daß bereits nach 20 min. Anoxie die Mastzellen degranuliert waren - d.h. ihr Histamin freigesetzt hatten. Nach 90 min. Ischämie beobachtete er bei seinen Versuchen das Auftreten eines neuen Typs von Mastzellen, die sich durch einen besonders hohen Gehalt an histaminhaltigen Granula auszeichneten. Möglicherweise stellen diese von SCHAUER nachgewiesenen Veränderungen der Histaminspeicher das morphologische Substrat unserer biochemischen Befunde dar.

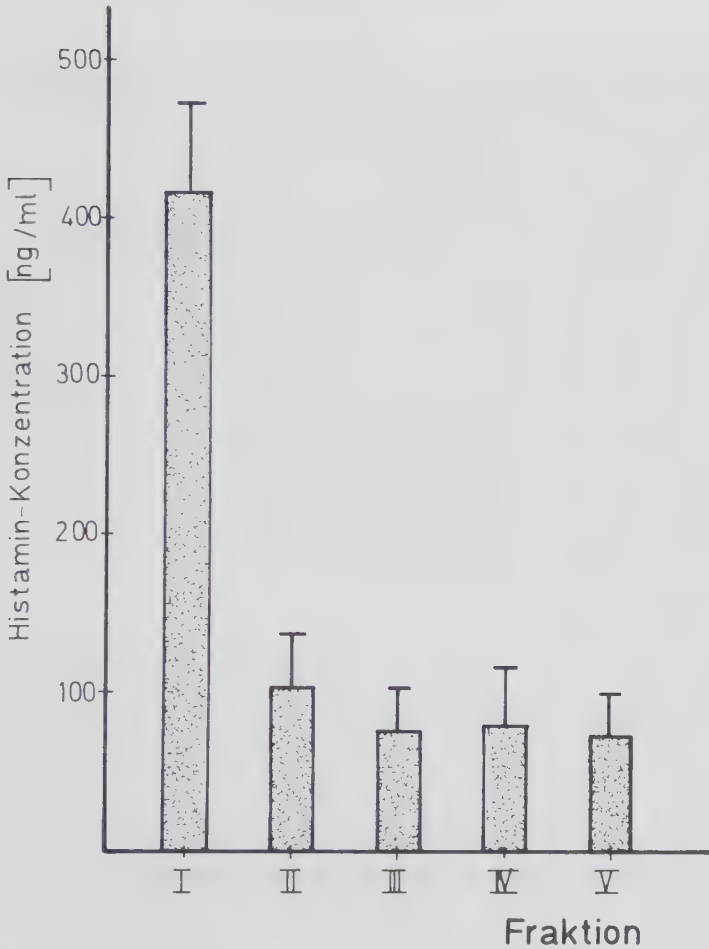


Abb. 24: Histamingehalt der Perfusionsflüssigkeit aus den Mesenterialgefäßen des ischämischen Kaninchendarms

Histamingehalt (ng/ml), Mittelwerte aus 5 Versuchen ($\bar{x} \pm S.D.$)

Volumen pro Fraktion I-IV = 100 ml

Fraktion V = 50 ml

Sonstige Bedingungen siehe Material u. Methodik.

III. 5.5. Beeinflussung der Überlebenszeit von Kaninchen nach intestinaler Ischämie durch die Verabreichung von Aminoguanidin in vivo

Aus dem hohen Histamingehalt des Perfusats und dem günstigen Einfluß der Perfusion auf die Überlebenszeit konnte geschlossen werden, daß Histamin eine der vasoaktiven Substanzen darstellte, die an der Auslösung des Kreislaufschocks nach Revaskularisation des ischämischen Darmes beteiligt waren. In diesem Fall käme der Diaminoxidase als einem Histamin abbauenden Enzym eine besondere Schutzfunktion bei diesem Krankheitsbild zu. Durch in vivo-Hemmung der Diaminoxidase mit dem spezifischen Hemmstoff Aminoguanidin versuchten wir, Hinweise für die pathophysiologische Bedeutung des Enzyms bei intestinaler Ischämie zu erhalten.

III. 5.5.1. Eine Dosis von 25 mg Aminoguanidin pro kg Körpergewicht verkürzte die Überlebenszeit der Kaninchen nach intestinaler Ischämie signifikant um 70 % ($p < 0,005$) (Abb. 25). Eine toxische Wirkung von Aminoguanidin konnte durch Versuche an scheinoperierten Tieren ausgeschlossen werden. Die Tiere erhielten die gleiche Dosis Aminoguanidin, jedoch ohne intestinale Ischämie. Sie wurden ebenfalls laparotomiert, die Arteria mesenterica superior wurde freipräpariert und umschlungen, aber nicht verschlossen. Die scheinoperierten Tiere überlebten mehrere Tage.

In der 2. Versuchsreihe (0, 10, 25, 30, 50, 100 mg Aminoguanidin pro kg Körpergewicht) nahm die Überlebenszeit mit zunehmender Dosis ab und betrug bei 100 mg Aminoguanidin/kg Körpergewicht nur noch $1/4$ (37 ± 15 min) der Überlebenszeit der Kontrolltiere (153 ± 59 min).

Versuchs-Nr.	Überlebenszeit		
	(min) Ischämie und Aminoguanidin (25 mg/kg i.v.)	(min) Ischämie und 0,9 % NaCl i.v.	(Tage) Scheinoperation + Aminoguanidin (25 mg/kg i.v.)
1	53	178	3
2	52	158	5
3	33	119	7
4	113	109	4
5	64	118	7
6	12	97	-
7	69	215	-
8	46	137	-
9	73	333	-
10	38	410	-
$\bar{x} \pm \text{S.D.}$	55 ± 27	187 ± 104	5 ± 2

Abb. 25: Einfluß von Aminoguanidin auf die Dauer der Re-
vaskularisationsperiode (Überlebenszeit) nach
Verschuß der Arteria mesenterica superior bei
Kaninchen.

Signifikanz zwischen Tieren mit und ohne Aminoguanidinbehandlung, $p < 0,005$ im Student-t-Test. Die scheineroperierten Tiere wurden nach 7 Tagen getötet, die übrigen Tiere verstarben am Ileus. Aminoguanidin wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Einzel- und arithmetische Mittelwerte $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ Zur Anlage des Experiments sowie Definition der Überlebenszeit siehe Material und Methodik.

Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 26) entspricht mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,91$ am ehesten einer hyperbolischen Funktion. Nimmt man jedoch an, daß Aminoguanidin durch kompetitive Hemmung der Diaminoxidase die Überlebenszeit beeinflußt, sollte sich theoretisch eine Exponentialfunktion ergeben. Tatsächlich erweist sich auch die Exponentialfunktion mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,81$ als statistisch hochsignifikant und kann ebenfalls, unter Berücksichtigung einer gewissen biologischen Ungenauigkeit des Versuchsmodells "Ganztier", dieser Dosis-Wirkungskurve zugrunde gelegt werden (Abb. 26). Diese Ergebnisse sprechen für eine protektive Rolle der Diaminoxidase bei intestinaler Ischämie.

III. 5.5.2. Mit dem Isotopentest fanden wir in den Darmproben, die allen mit Aminoguanidin behandelten Tieren unmittelbar vor Verschuß der Arteria mesenterica entnommen worden waren, keine meßbare Diaminoxidaseaktivität. Gereinigte Diaminoxidase aus Kaninchen-
darm, die wir den Proben zusetzten, wurde ebenfalls gehemmt. Die Hemmung betrug bei den Darmhomogenaten der mit 25 mg Aminoguanidin pro kg Körpergewicht behandelten Tiere 100 % und bei den mit 10 mg/kg Körpergewicht behandelten Tieren immer noch 93 %.

Diese Ergebnisse beweisen zwar nicht zwingend, daß die Diaminoxidase im Darm tatsächlich auch in vivo gehemmt wurde, sie beweisen aber die Anwesenheit von Aminoguanidin während der intestinalen Ischämie in der Darmwand und machen daher den Einfluß dieses Hemmstoffes auf die Diaminoxidase mehr als wahrscheinlich.

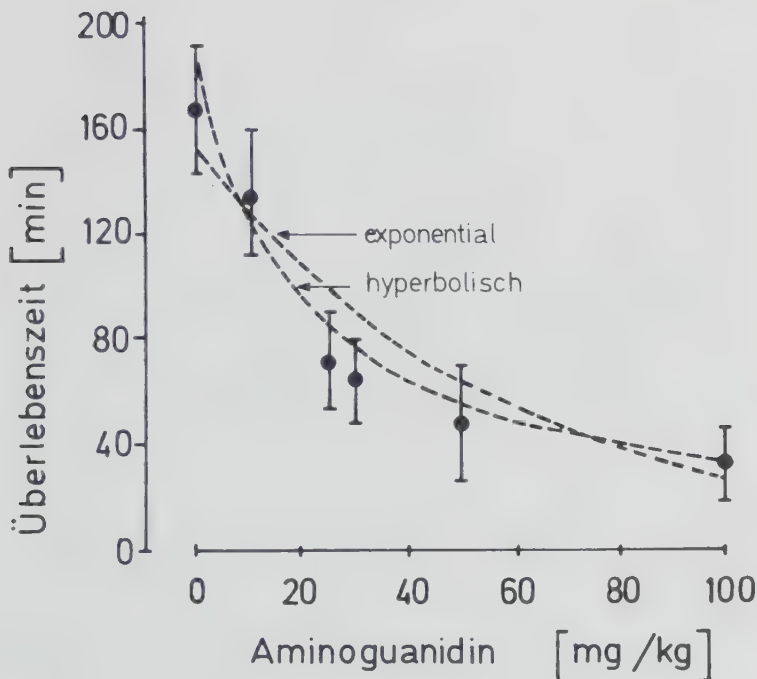


Abb. 26: Einfluß von Aminoguanidin auf die Überlebenszeit von Kaninchen nach Verschluß der Arteria mesenterica superior.

Mittelwerte $\bar{x} \pm$ S.D. von 5 Tieren pro verabreichter Dosis Aminoguanidin. Weitere Bedingungen siehe Material und Methodik.

IV. Diskussion

IV. 1. Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität im Isotopentest

Für die Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität in Geweben und Körperflüssigkeiten steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (LORENZ et al. 1967). Wendet man jedoch in der klinischen Chemie übliche Kriterien zur Beurteilung der Qualität enzymatischer Untersuchungen an, z.B. Empfindlichkeit, Spezifität, Präzision, Richtigkeit, Bequemlichkeit (RICHTERICH 1968), halten dieser Prüfung nur wenige Methoden stand. So konnte erst kürzlich gezeigt werden, daß der vielfach verwendete o-Dianisidin-Test (GORDON und PETERS 1967) für die Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität zu unspezifisch ist, da die Indikatorsubstanz ein Substrat für ein anderes Enzym (Coeruloplasmin) darstellt (BIEGANSKI et al. 1977).

Soweit die verwendeten Methoden die Voraussetzung der Spezifität erfüllten, waren sie entweder von den besonderen Eigenschaften des einen verwendeten Substrates abhängig und deshalb nur begrenzt einsetzbar, wie z.B. der o-Aminobenzaldehyd-Test, oder zwar von den Eigenschaften der Substrate unabhängig, wie die manometrische Messung des O_2 -Verbrauchs (ZELLER 1938 und 1963), aber zu unempfindlich, um als zuverlässige Methode gelten zu können.

Der NADH-Test erfüllte die Kriterien, nach denen die klinische Chemie eine Bestimmungsmethode beurteilt und hielt auch der Qualitätskontrolle stand (KUSCHE et al. 1974), hatte aber bei allen Vorteilen jedoch einen Nachteil: Er war nur im Serum (oder Plasma) und in vorgereinigten Gewebsextrakten verwendbar. Dieser Mangel konnte durch die Weiterentwicklung der

Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität mit Hilfe von ^{14}C -Putrescin ausgeglichen werden. Diese Methode war zwar auf die Messung des Umsatzes eines Substrates (Putrescin) beschränkt, gerade diese Tatsache gewährleistete aber die Spezifität der Methode. Erst die Durchführung beider Verfahren ermöglichte eine empfindliche Erfassung der Diaminoxidaseaktivität in Rohextrakten praktisch aller Gewebe und die anschließende Untersuchung der Eigenschaften des Enzyms.

Auch der Isotopentest zur Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität wurde bisher vorallem für die Bestimmung des Enzyms im Serum oder Plasma verwendet (SOUTHREN et al. 1966, SOUTHREN und WEINGOLD 1970). Für eine routinemäßige Durchführung hatte die von OKUYAMA und KOBAYASHI (1961) beschriebene Testprozedur jedoch einige Nachteile:

1. Wie bereits TRYDING (1965) zeigte, wurde bei der Originalmethode keine optimale Substratkonzentration verwendet.
2. Am Ende der Inkubation erfolgte die Unterbrechung der Enzymreaktion durch die Zugabe von Bikarbonat. Ein Reaktions-Stopp erfolgte dabei weder sofort noch vollständig, sodaß besonders bei höheren Enzymaktivitäten irrtümlich erhöhte Zählraten auftreten konnten.
3. Das Fehlen eines echten inneren Standards aus ^{14}C - Δ_1 -Pyrrolin erschwerte eine Umrechnung der erhaltenen cpm/min in internationale Einheiten (mU).

Um diesen Einwänden zu entgegnen, wurde der Isotopentest zur Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität wie beschrieben modifiziert und an Hand des NADH-Tests geeicht. Optimale Inkubationsbedingungen, wie z.B. Sub-

stratkonzentration und pH, können jedoch nur für die jeweilig untersuchte Diaminoxidase, z.B. des Kaninchen-dünndarms, als gültig betrachtet werden. Diese Bedingungen können sich von Organ zu Organ, z.B. bei Nieren-Diaminoxidase oder Darm-Diaminoxidase, und mehr noch von Spezies zu Spezies ändern.

Eine sichere und sofortige Beendigung der enzymatischen Reaktion wurde durch Zugabe von Perchlorsäure zum Inkubationsansatz erreicht. Dieser Schritt verschob jedoch den pH des Testansatzes in den stark sauren Bereich und machte somit eine pH-Korrektur nötig, die die Extraktion des zyklisierten Aldehyds in die organische Phase ermöglichte. Dabei erschien eine Titration jeder Einzelprobe bis zu einem pH von 10,0 unzumutbar, da das Volumen konstant gehalten werden mußte und außerdem ein Gesamtvolumen von nur 0,95 ml im Routinebetrieb sehr unbequem zu titrieren war. Einen Ausweg bot hier die Verwendung des "stark alkalischen Puffers", der, unter streng standardisierten Bedingungen hergestellt, eine bequeme und ausreichend präzise Einstellung des erforderlichen pH-Wertes ermöglichte.

Zur leichteren Durchführbarkeit des Testes trug ferner bei, daß die doppelte Extraktion zugunsten einer einmaligen verlassen wurde. Die zweite Extraktion steigerte zwar die Zählausbeute um ca. 15 %, die Isotopenmethode war aber unter den gewählten Bedingungen empfindlich genug und jede Komplizierung des Testverfahrens verursachte einen Verlust an Präzision.

Als Hinweis sei noch vermerkt, daß der Isotopentest nur in Gegenwart von Enzympräparaten verwendet werden kann, die den aus dem Amin gebildeten Aldehyd (γ -Aminobutyraldehyd) nicht umsetzen und somit der Zyklisierungsreaktion entziehen, d.h. die frei von Aldehyddehydro-

genase sind. Durch die Verwendung von Hemmstoffen dieses Enzyms läßt sich jedoch auch in Aldehyddehydrogenase haltigem Gewebe, wie z.B. der Leber, dieses Problem bewältigen (RÄMSCH und SCHMUTZLER 1975).

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Maßnahmen zur Optimierung und Standardisierung dürfte der Isotopentest mit ^{14}C -Putrescin die empfindlichste und bequemste Methode zur Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität in praktisch allen Organextrakten und Körperflüssigkeiten darstellen.

IV. 2. Vorkommen der Diaminoxidase im Gastrointestinaltrakt

Bereits in einer der ersten systematischen Zusammenstellungen der Verteilung der Diaminoxidase im Organismus (ZELLER 1942) zeigte sich, daß insbesondere der Dünndarm reich an Aktivität dieses Enzyms ist. Drei hauptsächlich Punkte der Lokalisation des Enzyms ließen sich erkennen: Niere, Plazenta und, wie erwähnt, der Darmtrakt. Diesen drei Lokalisationen ist gemeinsam, daß sie Schlüsselstellen der Entgiftung im Organismus darstellen. Der Diaminoxidase des Darmes käme vor allem die Aufgabe zu, das Eindringen von Histamin und anderen biogenen Aminen, die mit der Nahrung aufgenommen werden, in den Organismus zu verhindern.

Beim Kaninchen stellte sich auf Grund unserer Untersuchungen heraus, daß diese Spezies die bisher einzigartige Eigenschaft aufwies, nur im Intestinaltrakt Diaminoxidaseaktivität zu besitzen. Wie spezifisch das Vorkommen der Diaminoxidase selbst innerhalb dieses Organs ist, zeigt die Beobachtung, daß die normale Dünndarmschleimhaut eine signifikant höhere Diaminoxidaseaktivität aufweist als die Payerschen Plaques dieser Darmregion (KUSCHE unveröffentlicht). Da die Payerschen Plaques zum lymphatischen System des Splanchni-

cusgebietes zählen, erscheint es auf Grund dieser Beobachtung fraglich, ob die in den Mesenteriallymphknoten nachgewiesene Diaminoxidaseaktivität tatsächlich eine Leistung dieses Gewebes darstellt. Aus den Untersuchungen von CARLSTEN (1950) sowie von WOLLIN und JAQUES (1974) ist bekannt, daß intestinale Diaminoxidaseaktivität in den Ductus thoracicus freigesetzt wird. Es muß somit an die Möglichkeit gedacht werden, daß die in Mesenteriallymphknoten gefundene Diaminoxidase tatsächlich ein intestinales, durch den Lymphfluß zu diesem Organ transportiertes Enzym darstellt.

Für die Untersuchung der Bedeutung der Diaminoxidase im Verlauf einer intestinalen Ischämie bildete die alleinige Lokalisation des Enzyms im Darmtrakt des Kaninchens eine gute Voraussetzung, da eine Beeinflussung des Darmenzyms nicht durch eine veränderte Enzymproduktion in anderen Organen, z.B. in der Niere, kompensiert werden konnte.

IV. 3. Eigenschaften der intestinalen Diaminoxidase

Das Vorkommen von Aminoxydasen befähigt die Darmwand zur Inaktivierung eines weiten Spektrums von biogenen Aminen (KUSCHE et al. 1975). Einige dieser Amine, z.B. Histamin und Serotonin, greifen hochwirksam an der glatten Muskulatur der intestinalen Gefäße an. Auf diese Befunde stützt sich die Hypothese, daß es eine Aufgabe der Aminoxydasen des Darmes sein könnte, während einer intestinalen Ischämie den Einstrom von vasoaktiven Aminen in den Kreislauf zu verhindern (RICHTER et al. 1973, KUSCHE et al. 1973). Auch unter physiologischen Bedingungen ist eine intakte Diaminoxidaseaktivität des Darmes nötig, um eine für den Organismus gefährliche Resorption von Histamin zu verhindern.

SJAASTAD (1967) verfütterte an Schafe eine histaminreiche Nahrung und behandelte einen Teil der Tiere mit Aminoguanidin, dem spezifischen Hemmstoff der Diaminoxidase. Im Vergleich zu den Kontrolltieren stieg die Ausscheidung von freiem Histamin im Urin bei den behandelten Tieren um das 22-fache an und nur bei diesen Tieren traten Symptome einer Histaminvergiftung auf, die auf das Eindringen dieses Amins in den Körper hinwiesen.

Bei der Untersuchung der Eigenschaften der intestinalen Aminoxidase stellte sich heraus, daß im Organextrakt zwei lösliche Aminoxidasen vorlagen, die sich besonders hinsichtlich ihrer Stabilität und ihres Verhaltens bei Gelfiltration an Sephadex G 200 unterschieden. Zur weiteren Klassifizierung der Darm-Aminoxidasen als Diaminoxidase und lösliche Monoaminoxidase wurden drei typische Substrate und zwei spezifische Hemmstoffe verwendet. Dabei zeigte sich, daß das Putrescin abbauende Enzym sehr empfindlich gegen Aminoguanidin war und deshalb als Diaminoxidase angesprochen werden mußte. Dieses Enzym war gegenüber Serotonin inaktiv und wurde durch Pargylin nicht gehemmt. Das Enzym, das 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) desaminierte, war dagegen durch den spezifischen Monoaminoxidaseinhibitor Pargylin hemmbar und mußte deshalb als Monoaminoxidase angesehen werden. Dieses Ergebnis wurde dadurch unterstützt, daß Putrescin kein Substrat dieses Enzyms darstellte und Aminoguanidin als Hemmstoff unwirksam war.

Monoaminoxidasen sind gewöhnlich an Mitochondrienmembranen gebunden und können nur durch Ultraschall oder Netzmittel zum Teil in Lösung gebracht werden. Das lösliche Darmenzym, das ebenso auch im Dünndarm vom

Schwein und Hund nachgewiesen werden konnte (KUSCHE et al. 1975), stellt somit eine besondere Art der Monoaminoxidase dar, deren Lokalisation mit größter Wahrscheinlichkeit, auf Grund ihrer Löslichkeit, im Cytoplasma zu suchen ist. Ferner erscheint es wegen der Höhe der gefundenen Monoaminoxidaseaktivität unwahrscheinlich, daß es sich hier um einen geringfügigen, durch einen Artefakt in Lösung gegangenen Anteil der partikelgebundenen Monoaminoxidase handelt.

Sehr ähnliche Befunde, wie für die Aminoxydasen am Kaninchendarm gezeigt, erhoben BARDSLEY et al. (1974) an der menschlichen Plazenta. Trotz der Tatsache, daß Diaminoxidase und membrangebundene Monoaminoxidase in diesem Organ schon seit langem bekannt waren, isolierten die genannten Autoren eine weitere Aminoxydase und charakterisierten sie als lösliche Monoaminoxidase. Warum die Entdeckung der löslichen Monoaminoxidase in der Plazenta so lange auf sich warten ließ, ist schwer zu verstehen, zumal die Diaminoxidase dieses Organs schon seit 1937 bekannt war (DANFORTH und GORHAM 1937). Ein Grund mag die beträchtliche Instabilität der löslichen Monoaminoxidase gewesen sein, die das Enzym verschwinden ließ, sobald mit einem Organextrakt ein etwas zeitraubender Reinigungsschritt durchgeführt wurde.

IV. 4. Nachweis und Folgen der experimentellen Ischämie am Kaninchendarm

Bevor die pathophysiologische Bedeutung der Diaminoxidase und ihres einzigen vasoaktiven Substrates Histamin bei der intestinalen Ischämie untersucht werden konnte, war es nötig, ein standardisiertes und leicht

reproduzierbares Modell dieses Krankheitsbildes auszu-
arbeiten. Als einfaches Versuchsmodell wurde der tempo-
räre Verschuß der Arteria mesenterica superior am
narkotisierten Versuchstier gewählt. Zur Kontrolle
der Ischämie wurden histologische Untersuchungen der
Darmwand sowie Sauerstoffdruckmessungen an der Serosa
und Mucosa des Darmes durchgeführt. Beide Verfahren
zeigten eindeutig und übereinstimmend als Folgen der
Ischämie nach Arteria mesenterica superior-Verschuß
eine Hypoxie und als wichtigstes histologisches Sub-
strat Zottenspitzennekrosen.

Der Erfolg der Revaskularisation ließ sich mit der
Sauerstoffsonde anhand des sofortigen Anstiegs der
 O_2 -Spannung in der Darmwand eindrucksvoll nachweisen.

Die Diaminoxidaseaktivität der Darmwand nahm infolge
der Ischämie und Revaskularisation ab; ein Befund,
der nach den Untersuchungen von KUSCHE et al. (1972)
an der ausgeschalteten Schlinge des Hundeileums durch-
aus zu erwarten war. Überraschender Weise stand der
Abnahme der Diaminoxidaseaktivität in der Darmwand
kein adäquater Anstieg des Enzyms im Plasma gegenüber.
Eine ischämiebedingte Freisetzung der Diaminoxidase
aus dem Darm muß daher als wenig wahrscheinlich ange-
sehen werden.

Der Histaminspiegel der Darmwand stieg während der
Ischämie signifikant an und fiel nach der Revaskulari-
sation nahezu bis auf den Ausgangswert wieder ab. Die-
ser Befund spricht zusammen mit der hohen Histamin-
konzentration des Perfusats für die Hypothese, daß
Histamin während der Ischämie gebildet oder freige-
setzt und nach der Revaskularisation in den Kreislauf
ausgeschwemmt wird. Verstärkt werden könnte dieser
Vorgang dadurch, daß im Bereich der Mikrozirkulation
Liberierungsprozesse des Amins ablaufen, die sich auf
den Gewebshistamingehalt nicht auswirken, obwohl sie

gespeichertes, biologisch inaktives Histamin in biologisch aktives überführen (SCHAYER, persönliche Mitteilung 1975).

IV. 5. Perfusion der Mesenterialgefäße und Überlebenszeit bei intestinaler Ischämie

Ausgehend von der Hypothese, daß in den Kreislauf eingeschwennte vasoaktive Substanzen (darunter auch Histamin) verantwortlich sind für den Kreislaufzusammenbruch nach Verschluß der Arteria mesenterica superior und nachfolgender Revaskularisation, wurde versucht, diese Substanzen vor der Wiederdurchströmung der Darmgefäße aus dem Kreislauf zu eliminieren. Eine Perfusion der Mesenterialgefäße mit der Möglichkeit, das eventuell "toxin-haltige" Perfusat auf der venösen Seite aus dem Organismus zu eliminieren, erschien zur Prüfung dieser Hypothese geeignet. Tatsächlich führte die Perfusion der Mesenterialgefäße mit Ringerlösung zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit der Versuchstiere nach Verschluß der Arteria mesenterica superior, wobei betont werden muß, daß die Perfusion keinen Volumenersatz darstellte, da das arteriell infundierte Flüssigkeitsvolumen auf der venösen Seite wieder aufgefangen wurde. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese der Wirksamkeit vasoaktiver Substanzen bei intestinaler Ischämie.

Von dem Gesichtspunkt aus, daß in der Darmwand eine hochaktive Diaminoxidase vorkommt, stellte sich die Frage, ob durch die Perfusion möglicherweise auch ein vasoaktives Substrat dieses Enzyms, das nach heutiger Kenntnis nur Histamin sein konnte, aus dem Körper eliminiert wurde. Tatsächlich befanden sich in der Perfusionsflüssigkeit beträchtliche Histaminmengen. Bei der Beurteilung dieses Befundes sollte man jedoch gerade beim Kaninchen

vorsichtig sein, da diese Spezies einen hohen Histamingehalt in den Thrombozyten aufweist.

Sollte das im Perfusat nachgewiesene Histamin tatsächlich zum Kreislaufzusammenbruch nach intestinaler Ischämie beitragen, müßte sich im Gegensatz zur Verlängerung der Überlebenszeit durch Perfusion der Mesenterialgefäße eine Verzögerung oder Verhinderung der Histamininaktivierung in einer Verkürzung der Überlebenszeit bemerkbar machen. Diese verminderte Histamininaktivierung versuchten wir durch die Hemmung der Histamin abbauenden Diaminoxidase mit Aminoguanidin zu erreichen.

IV. 6. Wirkungen von Aminoguanidin auf den Organismus

Seit der Entdeckung der hemmenden Wirkung von Aminoguanidin auf die Histaminase (Diaminoxidase) (SCHULER 1952), ist bis heute kein stärkerer Hemmstoff des Enzyms gefunden worden. Auf Grund seiner Eigenschaften ist Aminoguanidin sehr gut für die orale oder intravenöse Anwendung geeignet:

1. Es ist nur gering toxisch. Dosen von bis zu 450 mg/kg Körpergewicht wurden von Mäusen (CARLINI 1968) und Meerschweinchen (WESTLING 1956) toleriert.
2. Es hat nur geringe Nebenwirkungen. BAYLIN (et al. 1975) fand eine Steigerung des Appetits aus bisher unbekannten Gründen. KUSCHE et al. (bisher nicht veröffentlicht) beobachteten einen Blutdruckanstieg bei Hunden, während LINDELL und WESTLING (1956) einen Blutdruckabfall bei Katzen und eine Zunahme des Blutflusses in der Nierenarterie beschreiben.
3. Hohe Spezifität: Keine Hemmung von Monoaminoxidasen

(KUSCHE et al. 1974), keine oder nur geringe Hemmung der Histaminmethyltransferase (IVY und BACH-RACH 1966) und der Histidindecaboxylase (LORENZ und WERLE 1967).

Die Untersuchungen des Histaminstoffwechsels in vivo von SCHAYER et al. (1953) und SCHAYER und REILLY (1974) bewiesen die Hemmung der Diaminoxidase durch Aminoguanidin und die Wirksamkeit des Enzyms im lebenden Organismus. Ähnliche Untersuchungen, die ebenfalls auf der Spezifität von Aminoguanidin beruhten, zeigten die Bedeutung der oxidativen Desaminierung beim Menschen (GRANERUS, WETTERQUIST u. WHITE 1968) und bei den Haustieren (ELIASSEN 1973).

In den oben angeführten Experimenten wurden neben den biochemischen Veränderungen keine Symptome einer Histaminakkumulation als Folge der Behandlung mit Aminoguanidin beobachtet, da die verabreichten Mengen nur sehr gering waren, die Experimente nur sehr kurz andauerten und ein gesteigerter Abbau über alternative Stoffwechselwege erfolgte. Bei der Zufuhr pharmakologisch effektiver Dosen steigerte Aminoguanidin jedoch die Wirkung von Histamin auf die Atmung, die isolierte Ileumschlinge, die Trachealmuskulatur und die Gebärmutter bei Meerschweinchen (WESTLING 1956), sowie auf die Sekretion der Glandula submandibularis (SEVERS et al. 1970) und des Magens bei Ratten (AMUR und GINSBURG 1964) und unter speziellen Bedingungen auf den Blutdruck bei Katzen (LINDELL und WESTLING 1956). Auf der anderen Seite hob es die Wirkung der Diaminoxidase im Organismus auf, was bei Meerschweinchen einen mangelhaften Schutz gegen Histamin und anaphylaktische Reaktionen zur Folge hatte (GIERTZ, HAHN und SCHMUTZLER 1967).

IV. 7. Beeinflussung der Überlebenszeit nach Arteria mesenterica superior-Verschluß durch Hemmung der Diaminoxidase

Wenn man die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchungen kritisch betrachtet, könnte sich die Frage stellen, ob die durch Aminoguanidin bedingte Hemmung der Diaminoxidase wirklich das Auftreten eines Kreislaufschocks nach Verschluß der Arteria mesenterica superior grundlegend beschleunigte. Schließlich verendeten alle Tiere, die der Testgruppe ebenso wie die der Kontrollgruppe, infolge der intestinalen Ischämie. Außerdem konnte in vitro keine zur dosisabhängigen Verkürzung der Überlebenszeit parallel gehende Hemmung der Diaminoxidase in der Darmwand gezeigt werden. Bei allen verabreichten Aminoguanidin-Dosen wurde das Enzym praktisch vollständig gehemmt.

Dem läßt sich entgegen, daß die Dauer der Darmischämie so gewählt worden war, daß alle Versuchstiere nur eine begrenzte Zeit überlebten, damit unspezifische Faktoren wie Infektionen, Peritonitis usw. kaum zur Wirkung kamen und das Versuchsmodell einfach und gut reproduzierbar war.

In vitro wurde die Aktivität der intestinalen Diaminoxidase zwar schon durch eine in vivo verabreichte Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht nahezu vollständig gehemmt, während sich die Überlebenszeit nur um 12 % verkürzte. Auf Grund der Verteilung von Aminoguanidin im Organismus (BEAVEN et al. 1969) erscheint es aber wahrscheinlich, daß die volle Hemmstoffkonzentration erst nach der Zerstörung der Zellwände durch die Homogenisierung auf das intrazellulär lokalisierte Enzym einwirken konnte.

Die Bedeutung der beobachteten Konzentrationsänderungen des Histamins in der Darmwand und im Perfusat war gerade beim Kaninchen schwer abzuschätzen, da diese Spezies eine außergewöhnlich hohe Histaminkonzentration im Blut enthält, hier vorallem in den Thrombozyten (HUMPHREY und JAKES 1954). Eine Thrombozytenaggregation in den Gefäßen kann jedoch bei intestinaler Ischämie keinesfalls ausgeschlossen werden, sodaß eine Histaminwirkung nicht notwendigerweise mit Konzentrationsänderungen des Amins korrelieren muß. Als günstigeres Versuchstier erwies sich bei dieser Frage der Hund, der normalerweise kein Histamin im Blut enthält (LORENZ und WERLE, in Druck). KUSCHE et al. (1977) fanden während und nach einer experimentellen Darmischämie bei mit Aminoguanidin behandelten Hunden einen erhöhten Plasmahistaminspiegel, sodaß tatsächlich beim Arteria mesenterica superior-Verschluß eine wirksame Freisetzung von Histamin in den Kreislauf angenommen werden kann.

Eine Zusammenfassung der Wirkungen von Aminoguanidin bei intestinaler Ischämie ergibt folgendes Bild:

1. Statistisch signifikante und streng Dosis bezogene Verkürzung der Überlebenszeit gegenüber unbehandelten Kontrolltieren.
2. Signifikanter Anstieg der Plasmahistaminkonzentration bei Hunden (KUSCHE et al. 1977).

Diese Befunde konnten zusammen mit der auch durch zahlreiche andere Autoren belegten Spezifität und Wirksamkeit von Aminoguanidin in vivo als Bestätigung aufgefaßt werden, daß

- Histamin zum Kreislaufversagen beim Mesenterialgefäßverschluß stark beiträgt und daß
- der Diaminoxidase eine Schutzfunktion bei diesem Krankheitsbild zukommt.

IV. 8. Diaminoxidasemangel und Krankheiten

Der Mesenterialarterienverschluß stellt nicht die einzige Erkrankung dar, die durch Hemmung der Diaminoxidase negativ beeinflußt wurde. Bei Schafen führte die orale Verabreichung von Aminoguanidin zu einer Histaminintoxikation, die mit einer um das 22-fache erhöhten Ausscheidung von freiem Histamin im Urin einherging (SJAASTAD 1967). Bei Meerschweinchen steigerte Aminoguanidin die Todesrate im Histaminschock (GIERTZ et al. 1967) und bei Ratten nahm die Häufigkeit von Stressulcera unter Aminoguanidin zu (FEIFEL und LORENZ 1972). In diesen Experimenten, bei denen die Diaminoxidaseaktivität gehemmt wurde, fanden sich erhöhte Histaminspiegel mit entsprechenden Krankheitszeichen.

GÄNG et al. (1976) fanden beim Menschen, dessen Darm normalerweise Diaminoxidase enthält, einen Mangel des Enzyms bei entzündlichen Erkrankungen. Es erscheint deshalb von klinischem Interesse, ob ein Zusammentreffen solcher Erkrankungen mit einer intestinalen Ischämie, wie sie nicht nur als Folge eines Mesenterialinfarktes sondern auch als Folge einer Verminderung des Herzminutenvolumens (BOUNOUS et al. 1963) oder einer funktionellen mesenterialen Minderdurchblutung ohne Gefäßverschluß (WILLIAMS und KIM 1971) auftreten kann, Histamin induzierte Komplikationen wie Stressulcera (FUNOVICS et al. 1973) oder einen Kreislaufkollaps hervorrufen kann.

V. Zusammenfassung

1. Zur Untersuchung der Diaminoxidaseaktivität in Organextrakten und Körperflüssigkeiten wurde die Isotopenmethode mit ^{14}C -Putrescin als Substrat standardisiert, optimiert und mit dem NADH-Test geeicht.
2. Die Diaminoxidaseaktivitäten betrugen im menschlichen Darm 0,3 - 6,2 mU/g Gewebe, beim Kaninchen betrug die Diaminoxidaseaktivität im Intestinaltrakt 1,5 - 12,6 mU/g Gewebe. In den anderen Organen des Kaninchens konnte keine nennenswerte Diaminoxidaseaktivität nachgewiesen werden.
3. Durch Gelfiltration an Sephadex G 50 und G 200 wurde die Diaminoxidase des Kaninchendarmes um das 100-fache angereichert und eine lösliche Monoaminoxidase abgetrennt.
Die gereinigten Aminoxydasen des Kaninchendarms zeigten folgende Eigenschaften: Diaminoxidase: pH-Optimum für Putrescin pH 6,8, für Histamin pH 7,6. K_m für Putrescin = $1,3 \times 10^{-4}\text{M}$, K_m für Histamin = $0,9 \times 10^{-4}\text{M}$, kein Abbau von Serotonin. Hemmung durch Aminoguanidin (Substrat Putrescin: $\text{ID}_{50} = 8 \times 10^{-7}\text{M}$, Histamin: $\text{ID}_{50} = 2,1 \times 10^{-8}\text{M}$), keine Hemmung durch Pargylin.
Lösliche Monoaminoxidase: pH-Optimum bei pH 6,4; 7,6 und 8,7. K_m für Serotonin = $1,8 \times 10^{-4}\text{M}$, kein Abbau von Histamin und Putrescin. Hemmung durch Pargylin, $\text{ID}_{50} = 3,4 \times 10^{-5}\text{M}$ mit Serotonin als Substrat.
4. Als Modell der intestinalen Ischämie wurde der akute, temporäre Verschluss der Arteria mesenterica superior am Kaninchen gewählt. Die Ischämie wurde durch den histologischen Nachweis einer Zottenspitzennekrose und des pO_2 -Abfalls in der Darmwand nachgewiesen.

Eine Perfusion des mesenterialen Gefäßbettes mit Ringerlösung im Anschluß an die Ischämie verlängerte die Überlebenszeit der Versuchstiere nach der Revaskularisation der Arteria mesenterica superior signifikant. Die Verabreichung des Diaminoxidasehemmstoffes Aminoguanidin in vivo führte dagegen zu einer signifikanten und dosisabhängigen Verkürzung der Überlebenszeit der Versuchstiere nach intestinaler Ischämie.

In der Darmwand nahm die Diaminoxidaseaktivität während Ischämie, Perfusion und Revaskularisation ab. Der Histamingehalt stieg während der Ischämiezeit an, kehrte jedoch nach Perfusion und Revaskularisation wieder auf den Ausgangswert zurück. Im Perfusat ließen sich beträchtliche Mengen Histamin nachweisen.

5. Auf Grund der vorgelegten Befunde wird dem Histamin eine Beteiligung am Auftreten des Kreislaufschocks nach intestinaler Ischämie zugeschrieben. Die Diaminoxidase, nicht jedoch die Monoaminoxidase, erfüllt auf Grund ihrer Möglichkeit zur Histamininaktivierung bei diesem Krankheitsbild eine Schutzfunktion.

S. BAYLIN, HORAKAVA, Z. and M. A. BEAVEN:

Increase in food consumption and growth after treatment with aminoguanidine.

Experienta 31: 562 (1975)

M.A. BEAVEN, J.W. GORDON, S. JACOBSEN, W.B. SEVERS:

A specific and sensitive assay for aminoguanidine: its application to a study of the disposition of aminoguanidine in animal tissues.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 165: 14 (1969)

C.H. BEST:

The disappearance of histamine from autolysing lung tissue.

J. Physiol. 70: 349-372 (1929)

H. BERGMEIER:

Methoden der enzymatischen Analyse.
2. ed. (Verlag Chemie 1970)

T. BIEGANSKI, M.Z. BLASINSKA und J. KUSCHE:

Determination of histaminase (DAO) activity by o-dianisidine test:

Interference of ceruloplasmin

Agent Actions 1977 (in Druck)

G. BOUNOUS, L.G. HAMPSON, F.N. GURD:

Regional blood flow and oxygen consumption in experimental hemorrhagic shock.

Arch. surg. 87: 340-354 (1963)

D.D. BROWN, R. TOMCHICK, J. AXELROD:

The distribution and properties of
a histamine methylating enzyme.

J. Biol. Chem. 234: 2948 (1959)

E. BÜLBRING und A. CREMA:

The action of 5-hydroxytryptamine,
5-hydroxytryptophan and reserpine
on intestinal peristalsis in anaesthe-
tized guinea-pigs.

J. Physiol. 146: 29-53 (1959)

F. BUFFONI:

Histaminase and related amine oxidase.
Pharmacol. Rev. 18: 1163-1199 (1966)

A.C. BURTON:

Physiologie und Biophysik des Kreis-
laufs.

Schattauer Verlag Stuttgart-New York
1969.

E.A. CARLINI and G.R. SILVA:

Lack of correlation between diamine
oxidase inhibitory strength and
catatonia-inducing property of
aminoguanidine.

Acta physiol. latinocem 18: 311 (1968)

A. CARLSTEN:

On the sources of the histaminase
present in thoracic duct lymph.

Acta Physiol. Scand. 20: Suppl. 5-26
(1950)

- L. CAVALLI-SFORZA: Biometrie, Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
G. Fischer Verlag, Stuttgart 1972
- J.F. COHNHEIM: Untersuchungen über die embolischen Prozesse.
Berlin: A. Hirschwald 1872
- D.N. DANFORTH und F. GORHAM:
Placental histaminase
Amer. J. Physiol. 119: 294-295 (1937)
- K.A. ELIASSEN: Metabolism of ^{14}C -histamine in goats and pigs with aminoguanidine.
Acta Physiol. Scand. 88: 1 (1973)
- V. ERSPAMER: Occurrence of indolealkylamines in nature.
Handb. Exp. Pharm. XIX: 132 (1966)
- J. FARA und U. HAGLUND:
Release of serotonin from the small intestine following hypotension in the cat.
Eur. Surg. Res. 5: 152-161 (1973)
- G. FEIFFEL, W. LORENZ, A. HUHND und B. ZEBORALSKI:
Die Bedeutung von Histamin bei der Pathogenese akuter Erosionen im Rattenmagen.
Res. exp. Med. 157: 206-207 (1972)

J. FUNOVICS, G. KRETSCHMER, F. PIZER, J. PREGEL, F. ZEKERT:
Experimentelle Untersuchungen über
die pathophysiologischen Folgen der
Mesenterialstenose auf den Magen.
Langenbecks Arch. Chir. 333: 29 (1973)

V. GÄNG, M. BALDUS, M. KADEREIT:
Serum level changes of endogenous and
post heparine diamine oxidase (hista-
minase) in clinical and experimental
hepatitis.
Acta Hepato-Gastroenterol. 23: 104
(1976)

H. GIERTZ, F. HAHN, G. SESEKE, W. SCHMUTZLER:
Über die Wirkung von Heparin und
Aminoguanidin auf den anaphylaktischen,
Anaphylatoxin- und Histamin-Schock
des Meerschweinchens.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. pharmak.
u. exp. Path. 256 (1967)

J.A.H. GOOSZEN:
The use of control charts in the
clinical laboratory.
Clin. Chim. Acta 5: 431 (1960)

G.R. GORDON und J.H. PETERS:
Plasma histaminase activity in
various mammalian species.
A rapid method of assay.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 124:
399-404 (1967)

G. GRANERUS, H. WETTERQUIST und T. WHITE:

Histamine metabolism in healthy subjects before and during treatment with aminoguanidine.

Scand. J. clin. Lab. Invest. 22:

Suppl. 104, 39 (1968)

U. F. GRUBER:

Intestinale Faktoren im Schock:
Darmtoxine.

Langenbecks Arch. klin. Chir. 319:
909-925 (1967)

J. H. HUMPHREY und R. JAQUES:

The histamine and serotonin content of the platelets and polymorphnuclear leucocytes of various species.

J. Physiol. 124: 305 (1954)

A. C. IVY und W. H. BACHRACH:

Physiological significance of the effect of histamine on gastric secretion.

Handb. Exp. Pharm. XVIII/1: 810 (1966)

A. JANOFF, A.L. NAGLER, S. BAEZ und B.W. ZWEIFACH:

Pathogenesis of experimental shock.
A lethal factor in the blood of rabbits following occlusion of the superior mesenteric artery.

J. Exp. Med. 114: 205-216 (1961)

- L. KAMESWARAN, J.N. PENNEFATHER, G.B. WEST:
Histamine and rat pregnancy.
Proc. J. Physiol. 162: 50-51 (1962)
- R. KAPPELLER-ADLER: Investigations on the activity
 of the histaminase in normal and
 toxaemic pregnancy.
 Biochem. J. 38: 270-274 (1944)
- R. KAPPELLER-ADLER: Histamine catabolism in vitro and
 in vivo.
 Fed. Proc. 24: 757-765 (1965)
- M. KESSLER: Normal and critical O₂ supply of the
 liver. in: Oxygentransport in blood
 and tissue. von:
 D.W. Lübbers, U. Luft, Thieme Verlag
 Stuttgart (1967)
- S.D. KHANNA: An experimental study of mesenteric
 occlusion.
 J. Path. Bact. 77: 575-590 (1959)
- K.S. KIM, B. BACKUS, M. HARRIS und P. ROURKE:
 Distribution of diamine oxidase and
 imidazol-N-methyltransferase along
 the gastrointestinal tract.
 Comp. Biochem. Physiol. 31: 137-145
 (1969)

J. KUSCHE, H. RICHTER, K.TH. SCHUMANN, J. SCHMIDT, W. LORENZ:

Diamine oxidase, histamine and histidine in the small intestine after experimental ischemia.

Journ. de Pharmacol. 3: 526-527 (1972)

J. KUSCHE, H. RICHTER, R. HESTERBERG, J. SCHMIDT, C.H.

SPECHT, W. LORENZ: Intestinal diamine oxidase: Isolation, substrate specificity and pathophysiological significance.

Agents Actions 3: 182-183 (1973) a

J. KUSCHE, H. RICHTER, R. HESTERBERG, W. LORENZ:

The role of humoral factors and diamine oxidase activity in shock after intestinal ischemia in rabbits.

Brit. J. Surg. 60: 904 (1973)

J. KUSCHE, U. v. TROTHA, G. MÜHLBERGER, W. LORENZ:

The clinical chemical application of the NADH-test for the determination of diamine oxidase activity in human pregnancy.

Agents Actions 4: 188-190 (1974)

J. KUSCHE, H. RICHTER, A. FRIEDRICH, J. SCHMIDT, R.

HESTERBERG, W. LORENZ:

Diamine oxidase in the small intestine of rabbits:

Separation from a soluble monoamine oxidase and alteration of the activity by intestinal ischemia.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Suppl. to 282, R 53 (1974)

J. KUSCHE, W. LORENZ, J. SCHMIDT:

Oxidative deamination of biogenic amines by intestinal amine oxidases: histamine is specifically inactivated by diamine oxidase.

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 356: 1485-1496 (1975)

J. KUSCHE, J. SCHMIDT, A. SCHMIDT, W. LORENZ:

Diamine oxidase in the small intestine of rabbits, dogs and pigs: Separation from a soluble monoamine oxidase and substrate specificity of the enzymes.

Agents Actions 5: 440-441 (1975)

J. KUSCHE, C.D. STAHLKNECHT, W. LORENZ, G. REICHERT,

H. RICHTER:

Diamine oxidase and intestinal ischemia. Agents Actions (1977) in Druck

A.M. LEFER, R. COWGILL, F.E. MARSHALL, L.M. HALL, E.D. BRAND:

Characterization of a myocardial depressant factor present in hemorrhagic shock.

Amer. J. Physiol. 213: 492-498 (1967)

A. M. LEFER und J. MARTIN:

Origin of myocardial depressant factor in shock.

Amer. J. Physiol. 218: 1423-1427 (1970)

- F. LEMBECK: 5-hydroxytryptamine in a carcinoid tumour.
Nature (London) 172: 910-911 (1953)
- S. E. LINDELL und H. WESTLING:
Potentiation by histamine inhibitors of the blood pressure responses to histamine in cats.
Acta Physiol. Scand. 37: 307-323 (1956)
- W. LORENZ und E. WERLE:
Zur Bestimmung der spezifischen Histidindecaboxylase.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348: 319 (1967)
- W. LORENZ, J. KUSCHE und E. WERLE:
Über eine neue Methode zur Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348: 561-567 (1967)
- W. LORENZ, J. KUSCHE, H. HAHN und E. WERLE:
Determination of activity of diamine oxidase, urease and histidine-ammonia-lyase by enzymatic assay of ammonia.
Z. Anal. Chem. 243: 259-263 (1968)
- W. LORENZ, J. KUSCHE und E. WERLE:
Diaminoxidase.in:
Methoden der enzymatischen Analyse
Ed.: H.U. Bergmeier, 2. ed., Verlag Chemie, 1970, S. 630

W. LORENZ, H. BARTH, J. KUSCHE, H. J. REIMANN, A. SCHMAL,
E. MATUEKA, CH. MATHIAS, M. HUTZEL, E. WERLE:

Histamine in the pig: Determination,
distribution, release and pharma-
cological actions.

Sur. J. Pharmac. 14: 155-175 (1971)

W. LORENZ, H.J. REIMANN, H. BARTH, J. KUSCHE, R. MEYER,
A. DOERNICKS and M. HUTZEL:

A sensitive and specific method for
the determination of histamine in
human whole blood and plasma.

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353:
911-920 (1972)

W. LORENZ, U. SENTSCH, H. BARTH, E. MATUEKA, R. MEYER,
J. KUSCHE, E. HUTZEL und E. WERLE:

Fluorometric assay of histamine in
tissues and body fluids:

Choice of the purification procedure
and identification in the nanogram
range.

Z. Analyt. Chem. 252: 94-96 (1970)

W. LORENZ, E. MATUEKA, A. SCHMAL, W. SEIDEL, H.J. REIMANN,

R. ONLIG and J. MANN: A phylogenetic study on the occur-
rence and distribution of histamine
in the gastro-intestinal tract and
other tissues of man and various
animals.

Comp. gen. Pharmac. 4: 229-250 (1973)

W. LORENZ, H. BARTH, M. THERMANN, A. SCHMAL, P. DORMANN
und I. NIEMEYER: Fluorometric histamine determination
in canine plasma under normal
conditions, following application of
exogenous histamine and during histamine
release by Haemaccel^(R).
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 355:
1097 (1974)

W. LORENZ und E. WERLE:

Vorkommen, Verteilung und subzellu-
läre Lokalisation von Histamin im
menschlichen, tierischen und pflanz-
lichen Organismus.
Ed.: R. Maxwell, Pergamon Press
Oxford (in Druck)

O.H. LOWRY, N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL:
Protein measurement with the folin
phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)

J. MARCOU, E. ATHANASIA-VERGU, D. CHIRICEANU, G. COSMA,
N. GINGOLD und C.C. PARHON:
Sur le role physiologique de l'hista-
mine.
Presse Med. 46: 371-374 (1938)

E. MITTENECKER: Planung und statistische Auswertung
von Experimenten.
5. Auflage, Wien (1964)

- B. MONDOVI, G. ROTILIO, A. FINAZZI, A. SCIOSCIA-SANTORO:
Purification of pig kidney diamine
oxidase and its identity with
histaminase.
Biochem. J. 91: 408-415 (1964)
- O. MUSTALA, O. ALFTHAN und P. PELTOKOLLIÖ:
5-hydroxytryptamine concentration
of total blood of rabbits following
occlusion of the superior mesenteric
artery.
Acta Chir. Scand. 134: 275-277 (1968)
- T. OKUYAMA und Y. KOBAYASHI:
Determination of diamine oxidase
activity by liquid scintillation
counting.
Arch. Biochem. Biophys. 95: 242-250
(1961)
- F. PAOLUCCI, L. CRONENBERGER, R. PLAN und H. PACHEO:
Purification et propriétés de la
diamine: oxygène oxydoreductase
du placenta humain.
Biochimie 53: 749-753 (1971)
- M. REIFFERSCHIEDT: Die Pathogenese des Darmverschlusses.
Zbl. Chir. 164, S.1531

K.D. RÄMSCH, W. SCHMUTZLER:

Solubilization and purification of
native guinea pig liver diamine
oxidase (histaminase).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
Suppl. to 287, R 63 (1975)

H. RICHTER, J. KUSCHE, K.TH. SCHUMANN, J. SCHMIDT und
W. LORENZ: Diaminoxidase, Histamin und Histidin
im Dünndarm nach experimenteller
Ischämie.
Langenb. Arch. klin. Chir. Suppl.
Chir. Forum: 295-298 (1973)

H. RICHTER, J. KUSCHE, K. TH. SCHUMANN, J. SCHMIDT und
W. LORENZ: Diamine oxidase and histamine in the
small intestine after experimental
ischemia.
Brit. J. Surg. 59: 912 (1972)

R. RICHTERICH: Klinische Chemie - Theorie und Praxis
Akad. Verlagsgesellschaft Frankfurt,
2. erw. Auflage 1968

B. ROMEIS: Mikroskopische Technik.
R. Oldenbourg Verlag München 1968

B.D. ROSS: Perfusion techniques in biochemistry.
A laboratory manual in the use of
the isolated perfused organs in
biochemical experimentation.
Clarendon Press. Oxford, S. 356-394
(1972)

- D. H. RUSSEL: The roles of the polyamines putrescine, spermidine and spermine in normal and malignant tissue. Life Sciences Vol. 13: 1635-1647 (1973)
- A. SCHAUER: Die Mastzelle. Veröffentl. morphol. Path. Vol. 68, G. Fischer Verlag Stuttgart 1964
- R.W. SCHAYER, J. KENNEDY und R.L. SMILEG: Studies on histamine metabolizing enzymes in intact animals. J. Biol. Chem. 205: 739 (1953)
- R.W. SCHAYER und M. REILLY: Histamine catabolism in guinea pigs, rats and mice. Eur. J. Pharmacol. 25: 101 (1974)
- R.W. SCHAYER: 1975, persönliche Mitteilung
- W. SCHMUTZLER, H. GIERTZ, F. HAHN, G. SESEKE, W. BERNAUER: The influence of aminoguanidine and heparine on shock in guinea pigs. Int. Arch. Allerg. 28: (1965)
- W. SCHULER: Zur Hemmung der Diaminoxidase (Histaminase). Experienta 8: 230-232 (1952)

- A. SENN: Der akute Mesenterialarterienverschluß.
Acta Chir. Austr. 1: 5-8 (1969)
- W.B. SEVERS, J.W. GORDON, M.A. BEAVEN und S. JACOBSON:
Some observation on aminoguanidine pharmacology.
Pharmacology 3: 201-203 (1970)
- P.A. SHORE, A. BURHALTER und V.H. COHN:
A method for the fluometric assay of histamine in tissues.
J. Pharmacol. exp. Ther. 127: 182-186 (1959)
- O.V. SJAASTAD:
Potentiation by aminoguanidine of the sensitivity of sheep to histamine given by mouth. Effect of aminoguanidine on the urinary excretion of endogenous histamine.
Quart. J. exp. Physiol. 52: 319-330 (1967)
- A.L. SOUTHREN, Y. KOBAYASHI, N.C. CARMODY, A.B. WEINGOLD:
Serial measurements of plasme diamine oxidase during normal human pregnancy by an improved method.
Amer. J. Obstet. Gynec. 95: 615-620 (1966)

A.L. SOUTHREN, Y. KOBAYASHI, W. JUNG, A.B. WEINGOLD:

Metabolism of ^{14}C -histamine injected into the fetal and maternal circulations of the perfused human placenta in vitro.

J. Endocrin. Metabol. 28: 1724-1729 (1968)

A.L. SOUTHREN, A.B. WEINGOLD:

Method for measuring plasma diamine oxidase.

Amer. J. Obstet. Gynec. 106: 1246-1247 (1970)

R.J. STRAUSS, K.A. RUBIN, F.A. NEWMANN, R.D. STRAUSS und J.H. STUCKEY:

Serotonine levels in portal vein plasma after occlusion of the superior mesenteric artery in dogs with intact and divided vagus nerves.

Surgery 74: 333-337 (1973)

N. TRYDING:

Micromethod for determination of plasma diamine oxidase. X. Meeting of the Scand. Soc. for Clin. Chem. and Clin. Physiol. (1965)

G. TUFVESSON und N. TRYDING:

Determination of diamine oxidase activity in normal human blood serum. Scand. J. Clin. and Labor. Investigation 24,2 (1969)

- T. E. WEICHSELBAUM: Protein determination by the biuret method.
Amer. J. Clin. Path. 10: 40-46 (1946)
- E. WERLE: Über das Vorkommen von Diaminoxidase und Histidindecaboxylase in Mikroorganismen.
Biochem. Z. 309: 61-76 (1941)
- E. WERLE und E. v. PECHMANN: Über die Diaminoxidase der Pflanzen und ihre adaptative Bildung durch Bakterien.
Justus Liebig Ann. Chem. 562: 44-60 (1949)
- E. WERLE, I. TRAUTSCHOLD und D. AURES: Reinigung und Charakterisierung der Diaminoxidase aus Erbsen.
Hoppe-Seylers Z. f. physiol. Chem. 326: 200-211 (1961)
- E. WERLE und V. SCHIRREN: Einfluß von Diaminoxidasegaben auf den anaphylaktischen Schock des Meerschweinchens.
Z. ges. exp. Med. 138: 522-530 (1965)
- H. WESTLING: Potentiation of histamine effects by histaminase inhibitors in the un-aesthetized guinea pig.
Acta Physiol. Scand. 38: 91 (1956)

L.F. WILLIAMS jr. und J.P. KIM:

Non occlusive mesenteric ischemia in
vascular disorders of the intestine.
ed.: S.J. Boley, Appleton Century
Crofts Education Division Meredith
Corporation: S. 519 (1971)

G.S.M. WILSON und J. BLOCK:

Mesenteric vascular occlusion.
Arch. Surg. 73: 452-455 (1956)

L. WISE:

The significance of serotonin in
the gastro-intestinal tract: Clinical
notes.
Surgery 74: 452-455 (1973)

A. WOLLIN und L.B. JAKES:

Increased diamine oxidase activity
in the intestinal lymph of rats on
fat ingestion.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 52:
760-762 (1974)

E.A. ZELLER:

Zur Kenntnis der Diaminoxidase.
3. Mitteilung über den enzymatischen
Abbau von Polyaminen.
Helv. chim. acta 21: 1645-1665
(1938 a)

E.A. ZELLER:

Über den enzymatischen Abbau von
Histamin und Diaminen.
Helv. chim. acta 21: 880-890 (1938)

E.A. ZELLER: Diamin oxidase
Advances Enzymol. 2: 93-112 (1942)

E.A. ZELLER: Diamine oxidases
The Enzymes, Vol. 8: 313-335 (1963)

Lebenslauf

Am 18. Januar 1950 wurde ich als Sohn des Fabrikanten Fritz Hesterberg und seiner Ehefrau Marietta, geb. Thun, in Hagen / Westfalen geboren.

1956 wurde ich eingeschult und besuchte ab 1960 das Gymnasium. 1968 legte ich am mathematisch-naturwissenschaftlichen Theodor-Heuss-Gymnasium in Hagen die Reifeprüfung ab.

Im Herbst 1968 schrieb ich mich an der Philipps-Universität in Marburg zum Biologiestudium ein. Nach einem Semester wechselte ich das Studienfach und studierte ab dem Sommersemester 1969 Medizin. Im Frühjahr 1970 bestand ich die naturwissenschaftliche und im Herbst 1971 die ärztliche Vorprüfung in Marburg.

Während der klinischen Ausbildung studierte ich die ersten zwei Semester an dem der Philipps-Universität angegliederten Lehrkrankenhaus in Kassel. Im Frühjahr 1975 legte ich das medizinische Staatsexamen in Marburg ab.

1974 heiratete ich Fräulein Heidrun Tonn und am 20. März 1975 wurde mein Sohn Matthias geboren.

Im Mai 1977 erhielt ich nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit die Approbation als Arzt.

Seit 1973 bin ich in der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Pathologische Biochemie in Marburg als Doktorand tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren
und Dozenten

in Marburg:

Amon, Arndt, Asai, Aurich, Barthelmai, Benz, Blencke,
Bock, Bode, Börngen, Bommer, Braasch, Brück, Buchholz,
Buchelt, Bürger, Büsing, Burrichter, Busch, Castenholz,
Dehnicke, Dimroth, Dittrich, Dombrowski, Doss, Egbring,
Egge, Eschenbach, Exner, Fuchs, Gallwitz, Gassel, Ger-
des, Gerhards, Göbel, Gössel, Golenhofen, Graul, Grund-
ner, Guntermann, Haberich, Habermehl, Hamelmann, Hamm,
Hartung, Haussmann, Hennig, Hennessen, Hensel, Hering,
Heß, Hildebrandt, Hildner, Hilgermann, Hilscher, Hort,
Huch, Jacob, Janzen, Joseph, Jobst, Kalbfleisch, Kaf-
farnik, Kappert, Karl, Karlson, Keil, Klaus, Klein,
Klump, Knauff, Koecke, Koransky, Kozak, Kühnel, Kuni,
Kunz, Langbehn, Lange, Lauth, Linneweh, Lorenz, Lüttcke,
Mannheim, Maroske, Martinez, Massarat, Milzner-Schwarz,
Mühlberger, Mühlfellner, Müller, Neumann, Neurath,
Nesswetha, Nöth, Oepen, Pemsel, Petersen, Petry, Pfab,
Popp, Portig, Prignitz, Puppel, Radsak, Rau, Reim,
Richter, Riecken, Rohen, Schachtschabel, Schaudig,
Schaumlöffel, Schiff, Schmid, Schmidt, Schmidt-Wilcke
Schneider, Schröder, Schubotz, Schulte-Hermann,
Schleyer, Scriba, Seidel, Seifart, Siebert, Sekeris,
Slenczka, Solcher, Sollmann, Stähler, Stockhausen,
Straub, Struck, Stutte, Uhlarik, Vielhauer, Vogel,
Vossen, Vohland, Walcher, Wesemann, Wehrmeyer, Wie-
gandt, Wrobel, Zehner

in Kassel:

Aust, Beckmann, Giebel, Heinecker, Janke, Kreutz,
Pfau, Rotthoff, Suchenwirth, Wepler, Wildhirt, Wulf,
Zinganell, Wolf

Ich danke Herrn Prof. Dr. LORENZ für das ständige Interesse und die Durchsicht der Arbeit.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. KUSCHE und Herrn Dr. RICHTER für die Anleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung und Durchführung der Versuche.

Den Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

'Intestinale Diaminoxidase:

Standardisierung und Optimierung eines Isotopen-
tests, Abtrennung von einer löslichen Monoaminoxidase und Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung des Enzyms bei experimenteller Darmischämie am Kaninchen'

im Institut für Experimentelle Chirurgie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. W. LORENZ mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. J. KUSCHE und Herrn Dr. med. H. RICHTER ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit zur Dissertation vorgelegt.

Marburg, im Mai 1977

